

Aus der Innere Medizin III – Klinik
(Kardiologie, Angiologie, Internistische Intensivmedizin),
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Böhm

Bedeutung von Integrinen für Adhäsion und Migration von Subpopulationen der Endothelialen Progenitorzellen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017

vorgelegt von: Mehmet Avsar
geb. am: 20. August 1986 in Saarbrücken

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	S. 7
1.1. Zusammenfassung (Deutsch).....	S. 7
1.2. Summary (English).....	S. 9
2. Einleitung.....	S. 11
2.1. Atherosklerose.....	S. 11
2.1.1. Definition.....	S. 11
2.1.2. Einleitung & Entstehung.....	S. 11
2.1.2.1. „Response-to-injury“-Hypothese.....	S. 12
2.1.2.2. „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese.....	S. 13
2.1.2.3. Atherosklerotische Plaques.....	S. 13
2.1.3. Risikofaktoren und Prävention.....	S. 14
2.2. Endotheliale Progenitorzellen.....	S. 14
2.3. Zelladhäsion.....	S. 17
2.3.1. Selektine.....	S. 18
2.3.2. Chemokine.....	S. 19
2.3.3. Integrine.....	S. 20
2.3.4. Immunglobulin- Superfamilie.....	S. 21
2.4. Fragestellung.....	S. 22
3. Material und Methodik.....	S. 23
3.1. Materialien.....	S. 23
3.1.1. Geräte.....	S. 23
3.1.2. Substanzen.....	S. 24
3.1.3. Lösungen.....	S. 25
3.1.4. Antikörper.....	S. 26
3.1.4.1. Nicht- fluoreszierende Antikörper.....	S. 26
3.1.4.2. Fluoreszierende Antikörper.....	S. 27
3.2. Methodik.....	S. 27
3.2.1. Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	S. 27

3.2.2. Auftrennung in EPC- Subpopulationen.....	S. 28
3.2.3. Fluoreszenzaktiviertes Zellsortiersystem.....	S. 30
3.2.3.1. Grundprinzipien.....	S. 30
3.2.3.2. Fluoreszenzmarkierung.....	S. 31
3.2.4. Adhäsion.....	S. 32
3.2.4.1. Zellkultur humaner Endothelzellen aus der Umbilikalvene.....	S. 32
3.2.4.2. Dynamisches Adhäsionsassay in der Flusskammer.....	S. 33
3.2.5. Migration.....	S. 35
3.2.6. Blockade der Integrine mittels Antikörper.....	S. 36
3.3. Statistik.....	S. 37
4. Ergebnis.....	S. 38
4.1. Expressionsprofil der Adhäsionsmarker auf EPC- Subpopulationen.....	S. 38
4.2. Adhäsionsfähigkeit der EPC- Subpopulationen.....	S. 44
4.3. Migrationsfähigkeit der EPC- Subpopulationen.....	S. 48
5. Diskussion.....	S. 51
5.1. Verteilung von β 1- und β 2- Integrinen auf den EPC- Subpopulationen.....	S. 51
5.2. Einfluss der Blockade von β 1- und β 2- Integrinen auf Adhäsion und Migration.....	S. 52
6. Literaturverzeichnis.....	S. 54
7. Dank.....	S. 64

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium
CAMs	Cell adhesion molecules
CD	Cluster of differentiation
CMFDA	5-chloromethylfluorescein diacetate
CXCL12	Chemokinligand 12
CXCR	Chemokinrezeptor
d. h.	Das heißt
Dil-Ac-LDL	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'- tetramethylindocarbocyaninelabeled – acetylated LDL
Easy Sep	Easy Separation
EBM	Endotheliales Basales Medium
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
EGM	Endotheliales Wachstums-Medium
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenzaktiviertes Zellsortiersystem
FBS	Fetal Bovines Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kalbserum
g	Gramm
GA-1000	Gentamicin Sulfat
h	Stunde
hEGF	Human epidermal Wachstumsfaktor

HEPES	2-(4-(2- Hydroxyethyl)-1- piperaziny)- ethansulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PE	Phycoerythrin
PET	Polyethylene terephthalate
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.	Seite
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tab.	Tabelle
u. a.	Unter anderem
v. a.	Vor allem
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-Rezeptoren	Very late antigen Rezeptoren
WHO	World Health Organisation
z. B.	Zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	Mikro

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung (Deutsch)

Einleitung: Die Atherosklerose stellt eine Erkrankung der Arterien dar, deren Folgen wie koronare Herzkrankheit oder Schlaganfall die Hauptmortalitätsursachen in den Industrienationen darstellen. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie beispielsweise Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie und Nikotinabusus sind mit einer erhöhten Progression dieser Erkrankung verbunden. Endotheliale Progenitorzellen wirken sich dagegen günstig auf die Atherosklerose aus. Sie besitzen die Fähigkeit zur de novo Synthese von Gefäßen. Ihre biologische Funktion ist durch Adhäsion und Migration vermittelt. Diese Mechanismen erlauben die Rekrutierung dieser Zellen aus der Blutbahn in die Gefäßwand zur Endothelreparatur und Gefäßneubildung. Innerhalb der endothelialen Progenitorzellen unterscheidet man anhand ihrer Oberflächenmarker zwischen verschiedenen Subpopulationen. Wir untersuchten die CD133+/CD34+, CD133+/CD34- und CD133-/CD34- Subpopulationen mit jeweils unterschiedlich starken Adhäsions- und Migrationsfähigkeiten. Die CD133+/CD34+ Subpopulation besitzt eine schwächere Adhäsions- und Migrationsfähigkeit als die CD133+/CD34- Subpopulation. Letztere besitzen eine hohe Adhäsions- und Migrationsfähigkeit, stellen die unreifste und potenteste Subpopulation dar. Sie können sich zur CD133+/CD34+ Subpopulation differenzieren. Die CD133-/CD34- Subpopulation stellt ausgereifte endotheliale Progenitorzellen dar. Diese exprimieren CD133 sowie CD34 nicht mehr. Sowohl die bislang entdeckten funktionell wichtigen Subpopulationen der endothelialen Progenitorzellen als auch der Mechanismus der Adhäsion sind bislang unzureichend charakterisiert.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den zellulären und molekularen Mechanismen der Adhäsion und Migration von Subpopulationen der endothelialen Progenitorzellen. Besonderes Interesse im komplexen Zusammenspiel der Adhäsionsmoleküle gilt hierbei den Integrinen. Mithilfe dieser Oberflächenantigene heften sich die Zellen fest an das Endothel an und transmigrieren durch das Endothel in das Gewebe ein. Es ist bislang unbekannt, welche

Integrine auf welchen Subpopulationen der endothelialen Progenitorzellen welche Relevanz für die Adhäsion und Migration haben.

Methoden: Aus peripherem Blut gesunder Probanden gewonnene Mononukleäre Zellen wurden mittels Gradientenzentrifugation isoliert und durch immunomagnetische Zellselektion in die CD133+/CD34+, CD133+/CD34- und CD133-/CD34- Subpopulationen der endothelialen Progenitorzellen aufgetrennt. Zunächst wurde die Expression spezifischer Adhäsionsmarker auf der Oberfläche dieser Subpopulationen in der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie quantifiziert. Des Weiteren wurden die drei Subpopulationen auf einer Zellkultur aus humanen Endothelzellen der Umbilikalvene unter dynamischen Bedingungen mittels laminarer Flusskammer zu Adhäsion sowie in modifizierten Boyden- Kammern zu Migration gebracht. Zusätzlich wurden β 1- und β 2- Integrine auf der Oberfläche der endothelialen Vorläuferzellen mit Antikörpern geblockt, um Auswirkungen durch den funktionellen Wegfall dieser Integrine auf die Adhäsion und Migration zu untersuchen.

Ergebnisse: Die am häufigsten exprimierten Adhäsionsmoleküle auf der Plasmamembran endothelialer Progenitorzellen waren β 1- und β 2- Integrine. Die CD133+/CD34+ Subpopulation exprimierte am häufigsten das β 2- Integrin auf ihrer Oberfläche. Die Blockade dieses Integrins führte zu einer Hemmung sowohl der Adhäsion als auch der Migration dieser Subpopulation. Die Blockade von β 1- Integrin hemmte die Adhäsion, jedoch nicht die Migration. Die CD133+/CD34- Subpopulation trug am meisten das β 1- Integrin auf ihrer Oberfläche. Die Blockade dieses Adhäsionsmoleküls als auch des β 2- Integrins führte jeweils zu einer Hemmung der Adhäsion ohne Einfluss auf die Migration. Die CD133-/CD34- Subpopulation exprimierte am häufigsten β 1- und β 2- Integrine ohne einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Integrinen. Die Blockade des β 2- Integrins führte zu einer Abnahme der Adhäsion, zeigte jedoch keinen Effekt auf die Migration. Die Blockade des β 1- Integrins konnte weder die Adhäsion noch die Migration dieser Subpopulation hemmen.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Integrine in der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der Subpopulationen der endothelialen Progenitorzellen unterschiedlich wichtige Rolle spielen. In allen drei untersuchten Subpopulationen waren die β 1- und β 2- Integrine signifikant mehr als die restlichen untersuchten Oberflächenantigene

exprimiert. Ihre Blockade mittels Antikörper führte zu einer Abnahme der Adhäsion und der Migration bei mehreren Subpopulationen.

Der gezielte Einsatz solcher Integrine wäre ein weiterer möglicher Ansatzpunkt am menschlichen Organismus in der Therapie der Atherosklerose und ihrer Folgen.

1.2. Summary (English)

Introduction: Atherosclerosis is a very serious disease of the arteries leading to coronary heart disease and stroke, which are the main causes of mortality in developed nations. Cardiovascular risk factors like diabetes mellitus, hypertension, hyperlipidemia and nicotine are connected with a higher progression of this disease. Endothelial progenitor cells have a positive effect on atherosclerosis. They have the ability for “de novo-synthesis” of vessels. Their biological function is being mediated by adhesion and migration. These mechanisms allow the recruitment of these cells out of the bloodstream into the vascular wall for endothelium repair and vascularisation. The endothelial progenitor cells are divided into different subpopulations regarding their surface marker. We analyzed the subpopulations CD133+/CD34+, CD133+/CD34- and CD133-/CD34-, each with differently strong abilities of adhesion and migration. The CD133+/CD34+ subpopulation has weaker abilities of adhesion and migration than CD133+/CD34- subpopulation. The CD133+/CD34- subpopulation have a strong ability of adhesion and migration and are the most immature and potent subpopulation. They can mature into the CD133+/CD34+ subpopulation. The CD133-/CD34- subpopulation is a subpopulation of mature endothelial progenitor cells. They don't express CD133 as well as CD34 anymore. Both the recently discovered functionally important subpopulations of endothelial progenitor cells and the mechanism of adhesion are so far insufficiently characterized. This work focuses on the cellular and molecular mechanisms of adhesion and migration of subpopulations of endothelial progenitor cells. Integrins play a determining role in the complex interplay of adhesion molecules. With the aid of these cell surface antigens, which consist of one α - and one β -chain, the cells stick to the endothelial tissue and transmigrate through the endothelium into the tissue. Up to now, the relevance

of integrins on different subpopulations of endothelial progenitor cells for the adhesion and migration is unknown.

Methods: Mononuclear cells, which were obtained from peripheral blood of healthy examined persons, were isolated by gradient centrifugation. Subsequently mononuclear cells were divided using immunomagnetic cell selection in CD133+/CD34+, CD133+/CD34- and CD133-/CD34- subpopulations of endothelial progenitor cells. First, these three cell populations were analyzed concerning the expression of specific surface adhesion marker in the fluorescently activated cell sorting system. Furthermore, the adhesion of the three subpopulations was analyzed in a cell culture with human endothelial cells of umbilical vein under dynamic conditions in the laminar flow chamber. The migration was analyzed in modified Boyden chambers. β 1 and β 2 integrins were blocked functionally on the surface of endothelial progenitor cells with antibodies in order to investigate the relevance of them to the adhesion and migration.

Results: The most frequently expressed adhesion molecules on endothelial progenitor cells were β 1 and β 2 integrins. The CD133+/CD34+ subpopulation expressed most the β 2 integrin on their surface. The blockade of this integrin led to an inhibition of adhesion and migration of this subpopulation. The blockade of β 1 integrin inhibited the adhesion, but not the migration. The CD133+/CD34- subpopulation showed most frequently β 1 integrin on their surface. The blockade of this molecule as well as the β 2 integrin led to an inhibition of adhesion without influence on migration. The CD133-/CD34- subpopulation expressed most β 1 and β 2 integrins without a significant difference between both integrins. The blockade of the β 2 integrin resulted in a decrease of the adhesion without effect on migration. The blockade of β 1 integrin inhibited neither adhesion nor migration of this subpopulation.

Conclusion: The results show that integrins play differently important role in the adhesion and migration of subpopulations of endothelial progenitor cells. β 1 and β 2 integrins were expressed significantly more than the rest of the examined surface antigens on subpopulations. The blockade of these integrins by antibody decreased the adhesion and

migration on several subpopulations. Such integrins could be a target on the human organism to treat atherosclerosis and its consequences.

2. Einleitung

2.1. Atherosklerose

2.1.1. Definition

Wörtlich: Bindegewebige Verhärtung der Arterien

Unter Atherosklerose (häufig synonym Arteriosklerose) versteht man nach der Definition der WHO eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen. Zusätzlich können Veränderungen der Media vorliegen [WHO, 1958].

2.1.2. Einleitung & Entstehung

Arteriosklerose ist die wichtigste und häufigste krankhafte Veränderung der Arterien. Sie stellt eine sich oftmals über Jahre und Jahrzehnte langsam und symptomlos entwickelnde Systemerkrankung dar. An ihren Folgen, die von Ischämie, Thrombose bis hin zum

Herzinfarkt, Schlaganfall oder plötzlichen Tod reichen, sterben die meisten Menschen in den westlichen Industrienationen [2, 8, 82]. Die KHK und Herzinfarkte verursachten in Deutschland im Jahr 2005 insgesamt mehr als 17 % aller registrierten Todesfälle [75]. Aufgrund der Vielzahl an der Atherogenese beteiligten Faktoren (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen, Thrombozyten, Lipoproteine, Wachstumsfaktoren, Cholesterin, Fette, Kollagen und Zytokine) war es bisher schwierig, eine einfache Hypothese für die komplexen Entstehungsmechanismen der Atherosklerose zu stellen. Insgesamt haben sich zwei Hypothesen etabliert:

2.1.2.1. „Response-to-injury“- Hypothese

Die 1976 von Russell Ross aufgestellte Hypothese führt die Entstehung der Atherosklerose auf eine initiale Endothelverletzung zurück. Neben mehreren Ursachen, die Ross aufzählt, führen auch turbulente Strömungen des Blutes zwangsläufig durch Apoptose einzelner Endothelzellen zu Endothelschäden. Dies ist auch die Erklärung für die gehäufte Lokalisation der Atherosklerose an Gefäßbifurkationen, die stets physikalisch bedingt den laminaren Fluss stören. Als ein Circulus vitiosus stören die Engstellen und Ausweitungen infolge der Atherosklerose ihrerseits wiederum den Blutfluss und setzen somit die Endothelschädigung fort. Bei Verletzung der Endothelzellschicht wird einerseits die Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima, andererseits eine Schaumzellbildung in der Intima und Media durch Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen ausgelöst. Als Schaumzellen werden gelbgelatinöse Fettzellen bezeichnet, die sowohl aus fettbeladenen Makrophagen, die wiederum subendothelial aus chemotaktisch stimulierten Monozyten hervorgegangen sind, als auch aus fettbeladenen glatten Muskelzellen entstehen. Diese ersten atherosklerotischen Läsionen nennt man auch „fatty streaks“ [49]. Die intakte Endothelschicht übernimmt eine zentrale Funktion in gesunden Gefäßen. Nach Entfernung der Endothelschicht konnte eine Einengung des Gefäßlumens durch Proliferation und

Migration glatter Muskelzellen gezeigt werden. Nach Regeneration der Endothelschicht war die Einengung des Lumens wieder rückläufig [28].

2.1.2.2. „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“- Hypothese

Der Nobelpreisträger von 1985 für Medizin Joseph Leonard Goldstein betrachtet in dieser Hypothese die Endothelzellverletzung nur als einen Teilschritt der Atherosklerose, betont dagegen die Bedeutung der zügigen Aufnahme von chemisch modifiziertem (oxidiertem) LDL- Cholesterin durch Makrophagen, die darauffolgend zu Schaumzellen umgewandelt werden [9].

2.1.2.3. Atherosklerotische Plaques

Im weiteren Verlauf sind beide Hypothesen identisch. Die Schaumzellen führen zu einer Entzündungsreaktion. Diverse proinflammatorische Zytokine bewirken eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen, die letztendlich die Anheftung zirkulierender Monozyten und T- Lymphozyten an die Endothelzellen vermitteln [51]. Die Inflammation kann auch auf tiefere Schichten der Arterienwand übergreifen, zu allmählichem Gewebeumbau und über einen längeren Zeitraum schließlich zu herdförmige Gewebeveränderungen, sogenannte Plaques, führen. Eine solche Plaque besteht aus einer

bindegewebeartigen Kappe und einem inneren Lipidkern, der das Resultat massenhaft abgestorbener Schaumzellen ist. Vor allem bei instabilen Plaques, die im Gegensatz zu stabilen Plaques durch eine besonders dünne Kappe umhüllt sind, kann es zum Aufbruch der Plaques mit anschließender lokaler Thrombosierung kommen. Zum einen kann dadurch der Gefäßdurchmesser sich verkleinern bis hin zum Verschluss des Gefäßes, zum anderen kann der Thrombus sich lösen und zu einer Embolie führen.

2.1.3. Risikofaktoren und Prävention

Als Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose gelten heute die arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen, Diabetes mellitus sowie unbeeinflussbare Faktoren wie familiäre Disposition und Alter. Auch in Zukunft werden aufgrund des Alterns der Bevölkerung die Folgekrankheiten der Atherosklerose weiterhin die Haupttodesursache sein [7]. Vermeiden der Risikofaktoren und Lebensstiländerung wie Nikotinkarenz, Gewichtsnormalisierung durch kalorien- und fettarme Ernährung bzw. mediterrane Kost und körperliche Aktivität, bilden demnach auch die Basis der Prävention.

2.2. Endotheliale Progenitorzellen

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) sind im Blut zirkulierende Vorläuferzellen, die zu Endothelzellen differenzieren können [4]. Sie besitzen die Fähigkeit zur de novo Synthese von Gefäßen und spielen somit eine wichtige Rolle sowohl in der Vaskulogenese der

Embryonalentwicklung als auch in der Angiogenese des Erwachsenen. Ihr biologischer Effekt wird über Adhäsion und Migration vermittelt. Die Mechanismen der Adhäsion und Migration werden gesondert aufgeführt.

Die EPCs werden durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker wie CD133 und CD34 charakterisiert [87]. CD133+ Stammzellen konnten die myokardiale Regeneration nach Infarkt verbessern [74]. In Nacktmäusen transplantierte CD133+ Vorläuferzellen aus humanem Nabelschnurblut gliederten sich in ischämische Kapillarnetze ein und förderten die Neovaskularisation [97].

EPCs im Erwachsenen wurden erst in den 1990er Jahren charakterisiert, als die in vitro Differenzierung einer aufgereinigten Population von CD34 positiven Zellen aus dem Blut adulter Mäuse zu Endothelzellen gelang [4]. Dies veränderte das bis dahin geltende Paradigma, dass postnatal eine Neubildung von Gefäßen nur durch Proliferation und Migration von ausdifferenzierten Endothelzellen ausgehend von vorbestehenden Gefäßen möglich ist [4].

Desweiteren gelang die Kultivierung und Umwandlung von CD34- Stammzellen aus dem Knochenmark der Maus in CD34+ Zellen [58]. Hierbei wurden CD34- Zellen auf Stromazellen aus dem Knochenmark kultiviert und mit einer Vielzahl von humanen Zytokinen stimuliert. Daraus resultierte, dass CD34- Zellen sich in vitro in CD34 exprimierende Zellen differenzierten [58].

Im Extremitäten- Ischämiemodell konnte eine Abnahme an CD133+/CD34+ EPCs und eine Zunahme an CD133+/CD34- EPCs möglicherweise als Konsequenz erhöhter Rekrutierung an Orten von Ischämie und Gefäßläsionen, erhöhter Adhäsion an ischämischem Gefäßendothel, bessere Reendothelialisierung und effizientere Reduktion von Läsionen durch die CD133+/CD34- EPCs gezeigt werden [25]. Auch in einem akuten Ischämiemodell wie beispielsweise instabile Koronarläsion, d. h. krankhafter Prozess in einer oder mehreren Koronararterie(n) mit der Folge einer Minderdurchblutung im nachgeschalteten Myokard, war die CD133+/CD34- EPC Subpopulation in stärkerem Maße hochreguliert als CD133+/CD34+ EPCs [25]. Fehlen dagegen diese EPCs im Blut, so kann z. B. eine Koronarläsion zu Koronarstenosen mit nachfolgender Minderdurchblutung fortschreiten. So fanden sich in einer In- Stent- Restenose weder CD133+/CD34- noch CD133+/CD34+ EPCs [24].

Patienten mit Diabetes und kardiovaskulären Gefäßerkrankungen wiesen weniger CD133+/CD34- EPCs auf [42]. Dagegen fanden sich keine Unterschiede in der Anzahl der CD133+/CD34+ EPCs zwischen Patienten mit und ohne Diabetes. CD133-/CD34- EPCs stellen eine ausgereifte Subpopulation, die CD34 und CD133 nicht mehr exprimiert, dar [12, 34, 66].

In zahlreichen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass EPCs an Orte ischämischer Gewebsschädigung und an Orte von Gefäßverletzungen rekrutiert werden, wo sie sich in Gefäßstrukturen einfügen, sich zu Endothelzellen differenzieren und eine Reendothelialisierung sowie eine Neovaskularisation vermitteln [25]. Solche Reparaturvorgänge von Endothelverletzungen sind neben der Atherosklerose auch für die interventionelle Therapie der koronaren Herzerkrankung bedeutsam. Die Reendothelialisierung durch die EPCs ist mit einer Unterdrückung der Neointimabildung nach Angioplastien assoziiert. Die Neointima ist ein Gewebe aus glatten Muskeln, das im Extremfall zu einer Restenose eines wiedereröffneten Gefäßes führen kann. Auch in dieser Hinsicht bieten EPCs neue präventive Ansätze [90]. In Vorarbeiten konnte eine altersabhängige Abnahme der EPC- Wirksamkeit ex vivo gezeigt werden, was zu einem beschleunigten vaskulären Remodeling bei ständiger Belastung des Endothels im Rahmen der Atherosklerose über die Lebensjahre hinweg führen könnte [45].

Möglicherweise fördern verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone die Freisetzung der EPCs aus dem Knochenmark und locken die EPCs über die Blutbahn an Orte wie beispielsweise eine Wunde, an denen Angiogenese abläuft [3]. Zur Gruppe der Zytokine gehören u. a. Chemokine wie z. B. SDF-1, die v. a. die Adhäsion und Migration von EPCs aktivieren. Auch Interferone, Interleukine, Kolonie- stimulierende Faktoren und Tumornekrosefaktoren zählt man zur Gruppe der Zytokine. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Mobilisation der EPCs aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation nicht nur durch eine akute und chronische Ischämie, sondern auch bei Herzinsuffizienz, bei körperlichem Training und durch die exogene Stimulation mit Statinen oder Zytokinen erfolgt [91]. Auffallend ist auch die Korrelation der Anzahl zirkulierender EPCs mit dem Überleben und der Prognose von Patienten mit KHK [92]. Neuere Arbeiten zeigten eine Reduktion der EPC- Zahl bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom bei

zusätzlichem Vorhandensein einer major depressiven Episode [18]. Zusammenfassend kommt den EPCs eine wichtige antiatherosklerotische und endothelprotektive Funktion zu.

2.3. Zelladhäsion

Die Adhäsion (von lateinisch adhaerere „anhaften“) bezeichnet in der Zellbiologie den Kontakt der Zellen untereinander oder mit einer extrazellulären Matrix. Moleküle, die die Zelladhäsion ermöglichen, werden Zelladhäsionsmoleküle, auch Cell adhesion molecules (CAMs) genannt. Sie erfüllen grundlegende Funktionen wie Gewebeszusammenhalt und interzelluläre Kommunikation. Dabei treten diese aus der Zelle herausragenden Membranproteine auf der Zelloberfläche mit anderen Proteinen in Wechselwirkung. Im Wesentlichen vermitteln Integrine sowohl die Adhäsion als auch die Migration der EPCs.

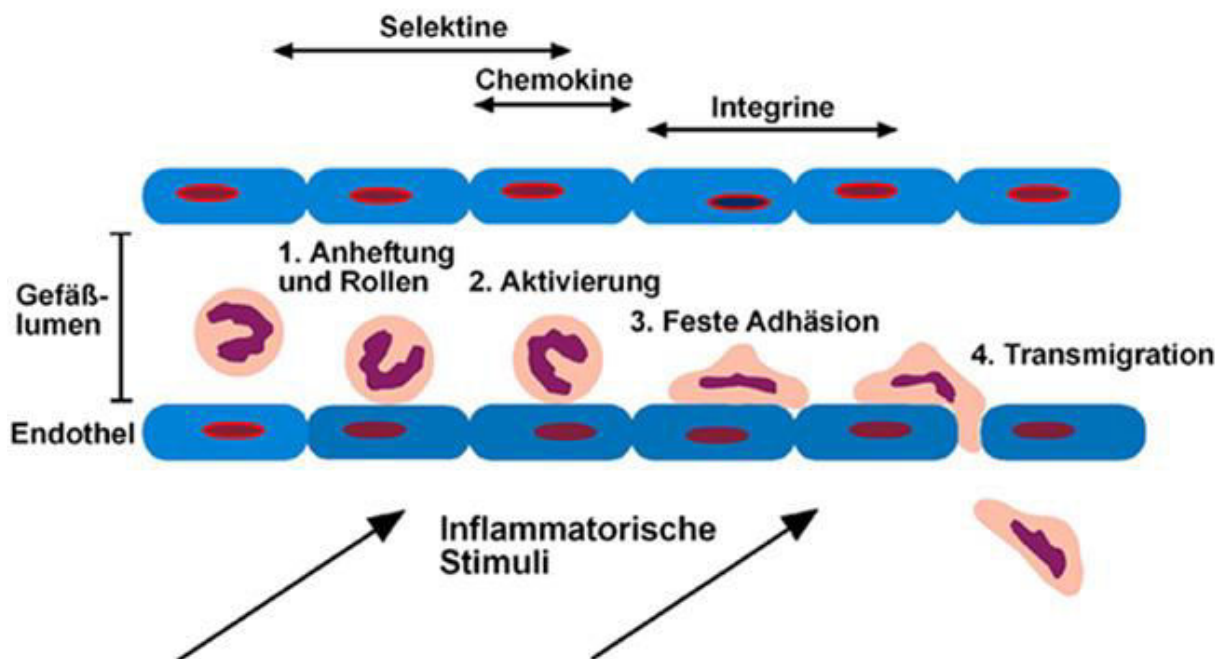


Abb. 1: Ablauf der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen [93]: Leukozyten treten mit durch inflammatorische Stimuli aktivierten Endothelzellen in Kontakt, indem sie zuerst selektinabhängig auf den Endothelzellen rollen. Nach chemokinvermittelter Aktivierung ihrer Integrinmoleküle heften diese sich fest an das Endothel an und flachen sich dabei ab. Schließlich transmigrieren die Leukozyten durch das Endothel und wandern in das entzündete Gewebe ein.

2.3.1. Selektine

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion wird das für Thrombozyten und Endothelzellen charakteristische P-Selektin (von englisch platelets) durch ausgeschüttete Mediatoren wie Histamin und Thrombin aus intrazellulären Vesikeln mobilisiert und an die Zelloberfläche verlagert. Neuere Studien legen neben Thrombin auch einen zusätzlichen Ca^{2+} -unabhängigen Signalweg zur Freigabe von P-Selektin dar [13]. Auf Endothelzellen kann zusätzlich durch Freigabe von Zytokinen wie Interleukin-1 und TNF durch beschädigte Zellen

die Expression des E-Selektins stimuliert werden [16]. Beide Selektine haben unterschiedliche Liganden und scheinen verschiedene Rollen in der Rekrutierung von Zellen im Rahmen der Immunantwort zu übernehmen [89].

Zusammenfassend besteht die Funktion der Selektine darin, dass sie Polysaccharid-Gruppen auf der Leukozytenmembran binden. Hierdurch kommt es wie in Abb. 1 dargestellt zum Rollen der Leukozyten auf dem Gefäßendothel und allmählich zur Abbremsung. So können die Zellen den Ort, an dem sie entzündungsbedingt das Gefäßsystem verlassen müssen, finden.

2.3.2. Chemokine

Chemokine stellen eine von mehreren bereits erwähnten Gruppen der Zytokine dar. Sie sind kleine Proteine mit Cysteinresten. Aus der Anzahl und Position der Cysteinreste lassen sich innerhalb der Chemokine vier Unterfamilien unterscheiden. CC-Chemokine sind dadurch charakterisiert, dass zwei Cysteinreste direkt aufeinanderfolgen. Bei den CXC-Chemokinen trennt eine Aminosäure beide Cysteine voneinander. Bei den CX3C-Chemokinen sind die Cysteine durch drei Aminosäuren voneinander getrennt. Kennzeichnend für diese Chemokinfamilien ist die Bildung von zwei Disulfidbrücken. Im Gegensatz dazu wird bei der C-Familie nur ein Cystein und eine Disulfidbrücke ausgebildet. Der Name der Chemokine setzt sich aus dieser Familienbezeichnung, einem Buchstaben L für Ligand und einer fortlaufenden Nummerierung zusammen. Chemokine steuern Immunzellen chemotaktisch, d. h. abhängig vom Chemokinkonzentrationsgradienten, zu Orten entzündlicher Prozesse wie auch im Rahmen von Atherosklerose. Zirkulierende Zellen können in Blutgefäßen mittels Chemokinrezeptoren wie die G-Protein gekoppelten, 7-Transmembran-umfassenden Rezeptoren rekrutiert werden, an das Endothel adhären und durch die Gefäßwand hindurch migrieren. Während die meisten Chemokine inflammatorisch wirken, d. h. bei Verletzung, Infektion, etc. produziert werden, tragen andere Mitglieder auch zur Homöostase bei, indem sie zur Überwachung gesunden Gewebes ständig produziert werden. Zu den letzteren Mitgliedern gehört auch das Stromal cell derived factor 1 (SDF-1), auch als Chemokinligand 12 (CXCL12) bezeichnet. Darüber hinaus fungiert es als Promotor der

Angiogenese [32, 48]. Insbesondere auch die EPCs werden durch SDF-1 mobilisiert und gelangen sowohl in vitro als auch in vivo zielgerichtet in ihre Verwendungsorte [35, 69, 96]. SDF-1 wird auch mit der Verbesserung der kardialen Funktion nach Myokardinfarkt assoziiert [70]. SDF-1 könnte dabei die Regeneration und Neovaskularisation des Herzes über neue Signalwege modulieren [61]. Zwei Chemokinrezeptoren, Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) sind für die Ausübung der Funktionen nötig [10], wovon v. a. der Erste auf Stammzellen exprimiert wird. Knockout- Mäuse, denen CXCL12 oder sein Rezeptor CXCR4 fehlt, sind aufgrund schwerer Organschäden nicht lebensfähig [54]. Darüber hinaus wird CXCR4 auch auf Endothelzellen, einer Reihe von Zellen des blutbildenden Systems wie beispielsweise Monozyten, ruhenden T-Zellen und dendritischen Zellen gefunden.

2.3.3. Integrine

Integrine sind in die Zellmembran integrierte Zelloberflächenproteine. Aufgrund der dauerhaften Verankerung in der Zellmembran bezeichnet man sie auch als Transmembranproteine. Diese Eiweißmoleküle kommen mit Ausnahme der Erythrozyten in allen tierischen Zellen vor. Integrine sind Heterodimere aus einer Alpha- und Beta-Untereinheit, die mittels Kalziumionen extrazellulär miteinander verbundene Glykoproteinketten darstellen. Das β 1- Integrin (CD29), das mit α 4 (CD49d) das Very late antigen 4 (VLA-4) bildet, und das β 2- Integrin (CD18), das mit α L (CD11a) das Lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) bildet, sind die für diese Arbeit wichtige Integrine. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass diese β - Integrine im Adhäsionsverhalten der EPCs entscheidend mitwirkten [25]. Aktuell wurde unsererseits ihre Bedeutung in der Adhäsionsfähigkeit der einzelnen EPC- Subpopulationen mittels Blockade durch Antikörper untersucht. Als bedeutende Liganden des LFA-1 fungieren die zur Ig- Superfamilie gehörenden ICAM-1 und ICAM-2. VLA-4 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Adhäsion der Lymphozyten an Endothelzellen, um in einen Entzündungsherd zu gelangen. VLA-4 bindet an Strukturen wie das vaskuläre Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) aus der Ig- Superfamilie oder Fibronectin. Durch Bindung an diese Moleküle können die Lymphozyten

durch Blutgefäße transmigrieren. Integrine spielen wie auch in Abb. 1 dargestellt eine große Rolle bei der Adhäsion. Deswegen werden sie häufig als Rezeptoren dafür verwendet. Hierbei erkennt das Integrin über die Bindungsstellen seiner äußeren (extrazellulären) Proteindomäne eine Aminosäurebindungssequenz im Proteinanteil wie der Extrazellulären Matrix (EZM)- Komponente - z. B. die RGD-Sequenz (Arginin- Glycin- Aspartat), die bekannteste aus einer Vielzahl an Erkennungssequenzen in der EZM. Sowohl Proteine mit der RGD-Sequenz wie Fibronektin als auch Proteine ohne diese wie z. B. ICAMs können gebunden werden [23]. Integrine sind an der Embryogenese, Blutstillung, Reparatur von Gewebe, Immunantwort wie beispielsweise Bindung von Viren oder gerichtete Wanderung von Leukozyten in Entzündungsherde und metastatischen Verbreitung von Tumorzellen beteiligt.

Trotz ihrer Bedeutung im Adhäsions- und Migrationsverhalten war bislang unbekannt, welche Integrine sich auf den verschiedenen EPC- Subpopulationen fanden. Wir konnten diesbezüglich neue Erkenntnisse gewinnen und die funktionelle Relevanz der häufigsten β -Integrine in den einzelnen EPC Subpopulationen hinsichtlich der Adhäsion und Migration untersuchen.

2.3.4. Immunglobulin- Superfamilie

Die Ig- Superfamilie besteht aus mehreren Adhäsionsmolekülen, unter anderem aus vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAMs) und interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs). Beide sind typischerweise auf Endothelzellen, ICAMs zusätzlich auch auf Immunzellen, zu finden. Sie erlangen besonders in Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle über die Vermittlung der Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Gewöhnlich fungieren sie dabei als endotheliale Liganden der auf Leukozyten vorkommenden Integrine.

2.4. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung neuer Erkenntnisse über das Adhäsions- und Migrationsverhalten der CD133+/CD34+, CD133+/CD34- und CD133-/CD34- EPC-Subpopulationen. Diese Subpopulationen zeigten in Vorarbeiten im Zusammenspiel mit dem SDF-1 Chemokin und β - Integrinen eine gesteigerte Adhäsions- und Migrationsfähigkeit [25, 86]. Bislang war jedoch die Verteilung der Integrine auf den verschiedenen EPC-Subpopulationen unbekannt.

Wir untersuchten die Expressionshäufigkeit von β - Integrinen sowie weiteren Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Zelladhäsionsmolekülen der Ig- Superfamilie auf den einzelnen EPC- Subpopulationen. Ziel war die Suche nach Oberflächenmarkern, die entscheidend die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit von EPCs steigern könnten. Wir stimulierten die EPC- Subpopulationen mit dem SDF-1 Chemokin und analysierten das Verhalten der einzelnen EPC- Subpopulationen in Hinsicht auf Adhäsions- und Migrationsfähigkeit.

Folgende Ziele wurden in der vorliegenden Arbeit festgesetzt:

- 1) Charakterisierung der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen bei frisch isolierten EPC- Subpopulationen
- 2) Funktionelle Relevanz der häufigsten Adhäsionsmoleküle hinsichtlich des Adhäsions- und Migrationsvermögens von EPC- Subpopulationen

3. Material und Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Autoklave	Colora, Lorch/ Württ
Blutröhrchen (Natrium- Citrat, 10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Blutröhrchen (Serum Gel, 4,7 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Brutschrank (Hera Cell 150)	Kendro, Langenselbold
Butterfly (Safety- Multifly- Set)	Sarstedt, Nümbrecht
Chamber (HTS Fluoroblock, 8 µM Poren)	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusssystem (FACS Calibur)	Becton Dickinson, Heidelberg
Easy Sep Polystyren Röhrchen	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
Eppendorfggefäß	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
Falcon (50 ml)	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E 600)	Nikon, Düsseldorf
Flusskammer (Parallel- Plate Flow Chamber)	Immunetics, Cambridge (UK)
Gewebekultur- Plattenböden (Polystyrene Cell Culture Slides)	Nalge Nunc Hereford (UK)
Magnet (Easy Sep)	Stemcell Technologies Inc, Grenoble (Frankreich)

Mikroskop (Olympus CK2)	Olympus, Hamburg
Neubauer- Zählkammer	Sarstedt, München
Objektträger	VWR, Wien (Österreich)
Skalpell	Braun, Melsungen
Sterilbank	Thermo, Schwerte
Zellkulturkammern (Chamber Slides)	Nalge Nunc, Hereford (UK)
Zentrifuge (Megafuge 1.OR)	Heraeus, Kleinostheim
Zentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus, Kleinostheim
Zentrifuge für Serum (Labofuge 400R)	Heraeus, Kleinostheim
Zentrifuge mit Temperatur	J. Thieme, Bensheim
24-Loch-Zellkulturplatten	Becton Dickinson, New Jersey (USA)

3.1.2. Substanzen

Aqua (vollentsalzt und destilliert)	Braun, Melsungen
BSA	PAA Laboratories, Linz (Österreich)
CD133/2-PE human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Tracker Green (CMFDA)	Invitrogen, Darmstadt
Dil-Ac-LDL (200 µg/ml)	CellSystems, Walkersville (USA)
EBM	Gibco, Eggenstein
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGM	Cambrex Bio Science, Vervier, Belgien
Ethanol	Merck, Darmstadt
FBS	Gibco, Eggenstein
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll- Histopaque (Biocoll)	Biochrom AG, Berlin
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako, Hamburg

GA-1000	Clonetics Cell Systems, Walkersville (USA)
hEGF	Cambrex Bio Science, Vervier (Belgien)
HEPES	Serva, Heidelberg
Human CD34 Selection Kit	Stemcell Technologies Inc, Grenoble (Frankreich)
HUVECs	Promocell, Heidelberg
Hydrochlorid (Tris HCl, Tris Base)	Chemos, Regenstauf
Hydrokortison	Cambrex Bio Science, Vervier (Belgien)
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄	VWR, Darmstadt
PE Selection Kit	Stemcell Technologies Inc, Grenoble (Frankreich)
SDF-1	R&D Systems, Wiesbaden
TNF-alpha	R&D Systems, Wiesbaden
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Türksfärbelösung	Merck, Darmstadt

3.1.3. Lösungen

Adhäsionspuffer	150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl ₂ , 0,05 % Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7,4
Cell tracker green (CMFDA)	Pro Ansatz 1 µM (Durch Verdünnung des 10 mM CMFDA mit EBM)
Easy Sep Puffer	98 % PBS + 2 % FKS + 2‰ (0,5 M) EDTA
Flow Chamber Lösung	99 % EBM + 1% FKS
Humanes Serum	Zentrifugation (Labofuge 400R, Heraeus) von peripher venösem Blut im Serumröhrchen bei 3000 rpm mit Bremse für 10 Minuten und anschließend Abnahme des Serums

HUVEC- Nährmedium	97,2% EGM + 0,5% BBE + 0,1% hEGF + 0,1% Hydrokortison + 2% FBS + 0,1% GA-1000
PBS- Puffer	Auffüllung von 2,4 g KH_2PO_4 (anhydrans), 14,4 g NaH_2PO_4 (anhydrans), 80 g NaCl, 2 g KCl mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) zu 1000 ml, pH 7,4; Anschließend 1:10 Verdünnung.

3.1.4. Antikörper

3.1.4.1. Nicht- fluoreszierende Antikörper

Bezeichnung	Molekül	Firma
Antihuman CD18	$\beta 2$ - Integrin	Chemicon Europe
Antihuman CD29	$\beta 1$ - Integrin	Chemicon Europe
Antihuman CD18	$\beta 2$ - Integrin	eBioscience
Antihuman CD29	$\beta 1$ - Integrin	eBioscience

Tab. 1a: Nicht- fluoreszierende Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrin (CD29) und gegen $\beta 2$ - Integrin (CD18)

3.1.4.2. Fluoreszierende Antikörper

Bezeichnung	Fluoreszenz	Molekül	Firma
Antihuman CD62E	APC	E-Selektin	BD- Bioscience
Antihuman CD11b	APC	α M-Integrin	BD- Bioscience
Antihuman CD11a	FITC	α L-Integrin	BD- Bioscience
Antihuman CD54	APC	ICAM-1	BD- Bioscience
Antihuman CD49d	APC	VLA-4	BD- Bioscience
Antihuman CD62P	FITC	P-Selektin	BD- Bioscience
Isotype Control, IgG1 kappa	PE	IgG1 κ	BD- Bioscience
Isotype Control, IgG1 kappa	APC	IgG1 κ	BD- Bioscience
Isotype Control, IgG1 kappa	FITC	IgG1 κ	BD- Bioscience

Tab. 1b: Fluoreszierende Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmarker

3.2. Methodik

3.2.1. Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Aus peripherem Blut freiwilliger gesunder Probanden ($n = 18$, Alter 34 ± 12 Jahre, 5 Männer und 13 Frauen ohne klinisch, elektro- sowie echokardiographisch nachweisbare kardiovaskuläre Begleiterkrankungen) wurde Blut in 10 ml Natriumcitratröhrchen entnommen. Pro Proband wurde 100 ml Blutprobe ($n = 18$) gewonnen. Die Zellen wurden stets unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur verarbeitet. Auf regelmäßiges Resuspendieren der Zellen zur Vermeidung von groben Zellklumpen in den einzelnen Suspensionen wurde bei jedem Einzelschritt geachtet. Zunächst wurden je 20 ml Blut in ein 50 ml Falcon überführt und in 15 ml PBS- Puffer gelöst. Anschließend wurde dieses Gemisch mit 15 ml der Dichtegradientenlösung Ficoll- Histopaque (Biocoll) vorsichtig und langsam überschichtet und bei 2200 rpm 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert (Megafuge 1.OR). Im

Anschluss wurden die PBMCs als milchige Mittelschicht im Falcon sichtbar. PBMCs sind einkernige Zellen des peripheren Blutes wie z. B. Lymphozyten und Monozyten. Im Weiteren wurden diese Zellen zweimal gewaschen. Dazu wurden sie zweimal ebenfalls bei 2200 rpm jedoch für 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert und jedes Mal nach Verwerfen des Überstandes mit 1 ml PBS- Puffer resuspendiert. Zur Zählung der PBMCs wurde 2 µl dieser Zellen jeweils mit PBS- Puffer 1:100 verdünnt und darauffolgend mit Türksfärbelösung im Verhältnis von 1:1 vermischt. Auf einer Neubauer- Zählkammer konnten die Zellen unter dem Mikroskop (Olympus CK2) gezählt werden. Die Berechnung der Zellzahl/ml ergab sich aus dem Produkt des Verdünnungsfaktors durch PBS- Puffer (1:100), durch die Färbelösung (1:2), des Zellfaktors (10000) und dem Quotienten aus gezählten Zellen und Anzahl der Quadranten, innerhalb deren gezählt worden war. Bei allen Blutproben (n = 18) gewannen wir $0,98 \times 10^8$ bis $2,15 \times 10^8$ /ml PBMCs. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission (Ärztekammer des Saarlandes Votumnummer 131/100) genehmigt.

3.2.2 Auftrennung in EPC- Subpopulationen

Im ersten Schritt wurden die PBMCs zur Gewinnung der CD34+ und CD34- Subpopulationen der EPCs mittels immunomagnetischer Zellselektion (EasySep) in einem 12 x 75 mm EasySep- Polystyren- Röhrchen mit 1 ml EasySep- Puffer aufgenommen und mit Human CD34 Selection Kit behandelt. D. h. es wurde zunächst ein 100 µl Selektionscocktail beigemischt und nach Ablauf einer 15 minütigen Wartezeit 50 µl magnetische Nanopartikel hinzugegeben. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten wurde die Suspension mit Gabe weiterer EasySep- Pufferlösung auf 2,5 ml aufgefüllt und in den Magneten (EasySep) eingeführt. Im Folgenden wurden die Zellen in die ersten beiden Subpopulationen der EPCs, nämlich CD34+ und CD34- Zellen, getrennt. Hierzu wurden die EPCs mehrmals nach unterschiedlich langen Wartezeiten im Magneten (15, 10, 10 und 5 Minuten) in ein für die CD34- Population vorbereitetes Falcon abgegossen. Die mit magnetischen Nanopartikeln

gebundenen CD34+ Zellen blieben jedesmal im Magneten zurück und wurden erneut durch EasySep- Puffer auf 2,5 ml aufgefüllt. Bei allen Blutproben (n = 18) gewannen wir jeweils $5,0 \times 10^5$ bis $18,1 \times 10^5$ CD34+ EPCs.

Im zweiten Schritt wurden die nach mehrfachen Abgießens aus dem Magneten in oben genanntes Falcon gewonnene CD34- EPCs zur Gewinnung der CD133+/CD34- und CD133-/CD34- Subpopulationen mittels immunomagnetischer Zellselektion (EasySep) nach erneuter Zentrifugation (Megafuge 1.OR) bei 1500 rpm mit Bremse für 7 Minuten analog zum ersten Schritt in einem 12 x 75 mm EasySep- Polystyren- Röhrchen mit 1 ml EasySep- Puffer erneut aufgenommen und mit PE Selection Kit behandelt. D. h. analog zur Behandlung der PBMCs mehrfach in den Magneten (EasySep) eingeführt und in die CD133+/CD34- und CD133-/CD34- EPCs getrennt. Hierzu wurden die EPCs mehrmals nach unterschiedlich langen Wartezeiten im Magneten (10, 5 und 5 Minuten) in ein für die CD133-/CD34- Population vorbereitetes Falcon abgegossen. Die mit magnetischen Nanopartikeln gebundenen CD133+/CD34- Zellen blieben jedesmal im Magneten zurück und wurden erneut durch EasySep- Puffer auf 2,5 ml aufgefüllt. In beiden Abschnitten wurde steril unter Raumbedingungen gearbeitet. Die CD133-/CD34- Subpopulation wurden analog zu den PBMCs gezählt. Bei allen Blutproben (n = 18) gewannen wir jeweils $0,99 \times 10^8$ bis $1,85 \times 10^8$ CD133-/CD34- EPCs.

Die CD133+/CD34+ und CD133+/CD34- Subpopulationen wurden nach einem Waschschrift bei 2000 rpm für 7 Minuten (Biofuge pico) in 500 µl PBS- Puffer aufgenommen. Zur Zählung wurden 5 µl dieser Zell- PBS-Suspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt um einen Zählfehler durch zu starke Verdünnung der ohnehin zellarmen Populationen zu vermeiden. Bei allen Blutproben (n = 18) gewannen wir jeweils $0,41 \times 10^6$ bis $2,65 \times 10^6$ CD133+/CD34- EPCs.

3.2.3 Fluoreszenzaktiviertes Zellsortiersystem

3.2.3.1 Grundprinzipien

Die FACS- Analyse basiert auf der Emission optischer Signale von Zellen bei der Passage durch einen Lichtstrahl spezifischer Wellenlänge in einem Durchflusszytometer. Genaugenommen sind es die emittierten Signale der auf den Zellen angebrachten Fluorochrome wie beispielsweise FITC, PE sowie APC, die detektiert werden. Hierbei handelt es sich um fluoreszierende Moleküle, die das Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und einen Teil davon in einer für sie typischen Wellenlänge wieder abgeben. Dank ihrer unterschiedlicher Emissionsspektren konnten somit FITC- und APC- konjugierte Antikörper gegen humane Adhäsionsmoleküle miteinander gekoppelt und dadurch stets zwei verschiedene Oberflächeantigene auf EPC- Subpopulationen gleichzeitig für FACS sichtbar gemacht werden. Mittels Photomultiplier konnten die Fluoreszenzemissionen weiter verstärkt und mittels Filter aufgetrennt detektiert werden. Darüber hinaus unterscheidet man ein Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), das ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel ist und von der Größe der Zelle abhängt, und ein Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter), das ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel ist und mit der Komplexität der Zelle (z. B. Granularität, Anzahl an Vesikel, Kerngröße und -struktur) korreliert. Die gesammelten Daten können im Computer als Punktwolke auf Graphen dargestellt werden.

3.2.3.2 Fluoreszenzmarkierung

Die isolierten EPC- Subpopulationen wurden mit 500 µl PBS- Puffer aufgenommen und mit 10 µl humanem Serum geblockt. Nach einer zehnminütigen Wartezeit bei 4 °C wurden die Zellen in mehreren Ansätzen mit fluoreszenzmarkierten und an humane Antigene bindenden Antikörpern (CD11b APC, CD11a FITC, CD54 APC, CD62P FITC, CD49d APC, CD62E APC und entsprechenden Isotypenkontrollen als Negativkontrollen) markiert und eine halbe Stunde bei 4 °C inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit den Fluoreszenzantikörpern im Dunkeln aufbewahrt um vorzeitige Fluoreszenzlichtemissionen durch Lichteinstrahlung im Raum zu vermeiden. Anschließend wurden die markierten Zellen mit weiterem 500 – 1000 µl PBS- Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm, 4 °C, 8 Minuten, J. Thieme, Bensheim). Nach Verwerfen des Überstandes wurde in zwei weiteren Waschschritten der Vorgang wiederholt bis schließlich das Pellet nach der letzten Zentrifugation in etwa 300 µl PBS- Puffer aufgelöst und zur durchflusszytometrischen Auswertung in ein FACS- Röhrchen überführt wurde. Das Volumen der Zellen im PBS- Puffer wurde dabei bewusst so niedrig und dementsprechend konzentriert gewählt. Die Auswertung erfolgte nach der Durchschleusung der Zellen durch das FACS- Gerät (FACS Calibur) mittels CellQuest Pro Software.

Die Isotypenkontrollen sind Negativkontrollen, die das Ausmaß an Hintergrundsignal des Primärantikörpers aufzeigen. Es wurde in allen Messungen von der detektierten Anzahl des Primärantikörpers subtrahiert [88].

3.2.4 Adhäsion

3.2.4.1 Zellkultur humaner Endothelzellen aus der Umbilikalvene

Die verwendeten HUVECs sind Zellen aus dem Endothel der Nabelschnurvenen von Neugeborenen. Sie wurden bei der Firma Promocell (Bestellnummer C-12200) bestellt und auf Trockeneis gelagert verschickt. Ein Teil der Zellen wurde sofort nach Lieferung aufgetaut und verarbeitet, der restliche Teil für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kultivierung erfolgte in EGM in Petrischalen. Hierbei wurden die HUVECs nach Zentrifugation für 5 Minuten in HUVEC- Nährmedium resuspendiert und auf 24-Loch-Zellkulturplatten zu jeweils 3×10^4 Zellen pro 0,5 ml EGM ausgesät. Die Inkubation erfolgte in einer 5 %-igen CO_2 Atmosphäre im Brutschrank (37°C). Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen durch Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen versorgt bis sich eine konfluente Einzelschicht bildete. Mittels Trypsin erfolgte ein- bis dreimalig die Subkultivierung, letztmalig 48 h vor Verwendung der Zellen im Adhäsionsassay. Für die Adhäsionsexperimente wurden 1×10^5 HUVECs auf mit Fibronektin ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten Deckgläschen ($24 \times 60 \text{ mm}$) auf einer 24-Loch-Zellkulturplatte in Form von drei EPC- Subpopulationen mit jeweils drei Konditionen in den späteren Adhäsionsversuchen verteilt. Mindestens 4 h vor der Gabe der EPCs zur Adhäsion auf die HUVECs wurden diese Endothelzellen mit 500 μl einer Lösung, die aus aufgetautem 10 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ und warmem Nährmedium im Verhältnis 1:1000 zusammengemischt worden war, stimuliert und in den Brutschrank (37°C) zurückgestellt.

Für Adhäsionsversuche in der laminaren Flusskammer wurden ca. 2500 HUVECs/ cm^2 in jeweils 400 μl frischem EGM in die Kammern ausgesät. Hierbei handelte es sich um spezielle 0,8 cm^2 große Zellkulturkammern (Chamber Slides) mit Fibronektin beschichteten Gewebekultur- Plattenböden (Polystyrene Cell Culture Slides). Das Fibronektin wurde mit PBS- Puffer im Verhältnis 4:100 verdünnt und in jede Kammer mit einer Menge von 100 μl verteilt. Das mit Fibronektin versetzte PBS- Puffer wurde nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C abgesaugt. Die Kultivierungszeit betrug in der Regel 5 – 9 Tage. Die Zellkulturkammern wurden unter der Sterilbank auf die Mitte der Gewebekultur- Plattenböden aufgesetzt und mit frisch angerührtem, flüssigem Agarosegel fixiert, möglichst

ohne dabei die Stellung der Kammern zu verändern. Nach Erhärten des Agarosegels wurden die Gewebekultur- Plattenböden in sterile Petrischalen gelegt.

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurden dann die Zellkulturkammern nach der Ablösung von den Gewebekultur- Plattenböden mit dem Zellrasen nach innen in die Mitte der Gummiringabdichtungen der Flusskammer aufgesetzt.

3.2.4.2 Dynamisches Adhäsionsassay in der Flusskammer

Nach der Auftrennung durch Gradientenzentrifugation und immunomagnetischer Zellselektion wurden die EPC- Subpopulationen jeweils zu 5×10^5 Zellen in 100µl Flow Chamber Lösung aufgenommen. Anschließend wurde in der laminaren Flusskammer (Parallel- Plate Flow Chamber) unter physiologischen Flussbedingungen die Adhäsion der EPC- Subpopulationen an endotheliale Zellen beobachtet. Zell- Zell- Interaktionen konnten anhand des speziellen Aufbaus der Flusskammer in Echtzeit analysiert werden. Zu Versuchsbeginn wurden die EPCs in ein Reservoir, das in die Flusskammer mündete, überführt. Von dort aus wurden sie auch im Laufe eines Durchlaufs mit einer einmaligen SDF-1 Gabe stimuliert. Eine angeschlossene Wasserpumpe erzeugte durch Unterdruck einen luftdichten Abschluss zwischen der Flusskammer und Endothellzellrasen und ermöglichte somit die Wanderung der einzelnen EPC- Subpopulationen in der Flusskammer über den HUVECs. Dabei wurden die Zellen mit Scherkräften von 2 dyn/cm^2 und einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,78 ml/min durch die Kammer hindurch perfundiert. Die feste Adhäsion (definiert als eine Adhäsionsdauer von mehr als 3 Sekunden) der durchfließenden EPCs wurde in Auflichtmikroskopie mittels angeschlossener Videokamera aufgezeichnet und quantitativ ausgewertet.

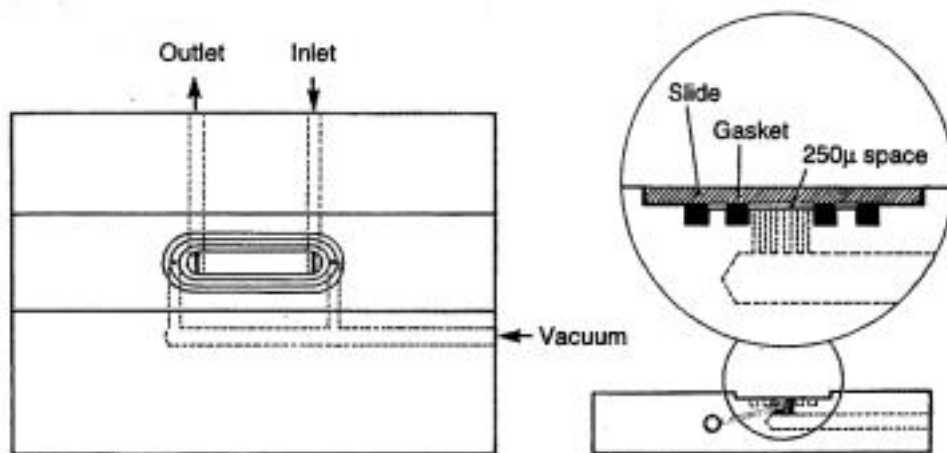


Abb. 2a: Schema der laminaren Flusskammer (Parallel- Plate Flow Chamber) [14]

Der Endothelzellrasen wird nach Züchtung auf Gewebekultur- Plattenböden auf die glatt- ovalen Dichtungsringe (Gasket) der Flusskammer gesetzt. Eine angeschlossene Wasserpumpe erzeugt Unterdruck (Vakuum), sodass ein luftdichter Abschluss zwischen Flusskammer und Zellrasen hergestellt wird. Die suspendierten EPCs werden durch die Ein- und Ausstrombahn (Inlet und Outlet) im 250 µm Spalt mit Scherkräften von 2 dyn/cm² über den Zellrasen gepumpt.

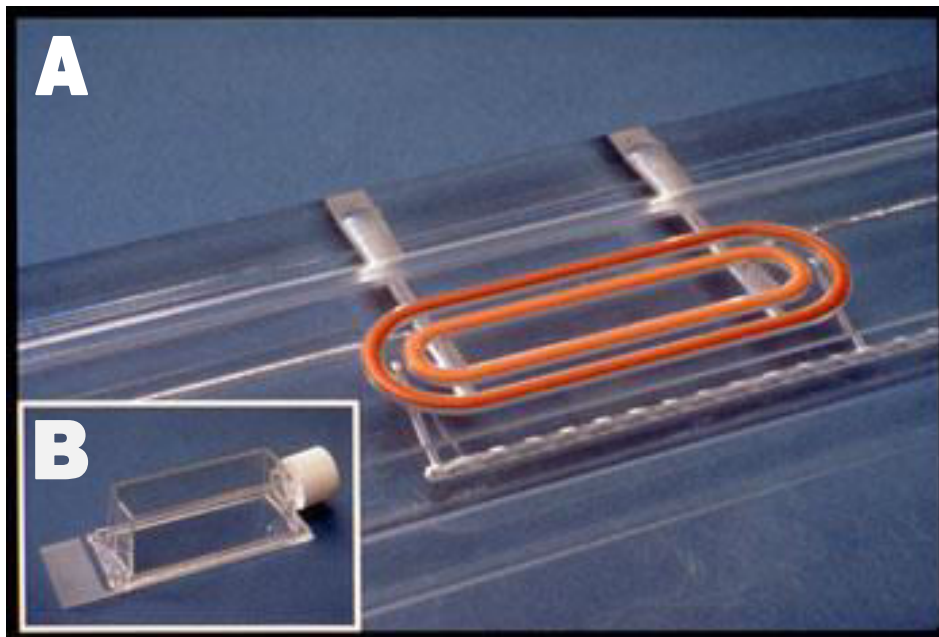


Abb. 2b : Fotografische Darstellung der laminaren Flusskammer (Parallel- Plate Flow Chamber) im großen Bild und der Zellkulturkammer im kleinen Bild am linken unteren Rand der Abbildung [14]

A: Ein- und Ausstrombahn (Inlet und Outlet) und der Anschluss für die Wasserpumpe sind im Plexiglas erkennbar. Die glatt- ovalen Dichtungsringe der laminaren Flusskammer liegen auf dem Plexiglas.

B: Eine Zellkulturkammer zur Anzuchtung eines endothelialen Zellrasens aus HUVECs zur Durchführung von Adhäsionsversuchen in der laminaren Flusskammer exemplarisch dargestellt. Der Gewebekultur- Plattenboden wird zu Beginn eines Versuchs von der Zellkulturflasche gelöst, mit dem Zellrasen nach innen mittig auf die Gummidichtungen der Flusskammer aufgesetzt und dort durch Erzeugung des Unterdrucks fixiert.

3.2.5 Migration

Die drei EPC- Subpopulationen wurden jeweils mit CD29- Antikörper gegen das $\beta 1$ - Integrin und CD18- Antikörper gegen das $\beta 2$ - Integrin geblockt sowie als Positivkontrolle ungeblockt mit jeweils 750 μl EBM und mit SDF-1 im Verhältnis 1:100 stimuliert vorgelegt. Nach Gradientenzentrifugation und immunomagnetischer Zellselektion wurden von den drei Subpopulationen (CD133+/CD34+, CD133+/CD34-, CD133-/CD34-) je 1×10^5 Zellen in 100 μl EBM aufgenommen und mit je 2,5 μl (2,5 μg) des CD18- und des CD29- Antikörpers geblockt

bzw. zur Kontrolle nicht geblockt. Nach einer halbstündigen Pause bei Raumtemperatur wurden diese 100 µl Zellsuspensionen mit weiteren 400 µl EBM aufgefüllt, vorsichtig an den inneren Rand von Zellkammern hineinpipettiert und anschließend in EBM mit SDF-1 eingelegt. Bei diesen Zellkammern handelte es sich um eine sogenannte Boyden- Kammer. Diese vor allem bei Chemotaxisversuchen Verwendung findende Kammer besteht aus zwei Abteilungen, die durch eine Membran mit Poren in der Größe von etwa 5 bis 10 µm getrennt sind. In unseren Versuchen wurde hierbei eine farbige und mikroporöse Polyethylenterephthalat (PET)- Membran verwendet. Diese Membran ist für das Licht wichtiger sichtbarer Wellenlängen (490 - 700nm) undurchlässig, wodurch sie später unter dem Fluoreszenzmikroskop eine gezielte Erkennung und Quantifizierung von fluoreszenzmarkierten Zellen ermöglicht. Die EPCs diffundieren entsprechend dem Konzentrationsgefälle in den Poren der Membran. Nach 24- stündiger Inkubation bei 37 °C, in der die Zellen durch die PET- Membran hindurch migrierten, wurde den Kammern vorsichtig das überschüssige EBM abgesaugt, die Kammern dann in einer PBS- Puffer enthaltenden 24-Loch-Zellkulturplatte gespült und anschließend in eine neue mit DiLDL (5 µl) und EGM (300 µl) zusammengesetzte 24-Loch-Zellkulturplatte eingesetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden die Kammern nochmals mit PBS- Puffer gewaschen, anschließend der Membranfilter ausgeschnitten und auf dem Objektträger platziert.

Im Anschluss kamen ein Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium und ein Deckgläschen auf den Filter drauf. Schließlich wurden die Präparate im Dunkeln getrocknet. Die gewanderten EPCs wurden mikroskopisch ausgewertet. Dazu wurde der ganze Filter mit dem 40x Objektiv schlangenlinienförmig nach migrierten EPCs durchsucht.

3.2.6 Blockade der Integrine mittels Antikörper

Leukozyten heften sich mithilfe des β 1- Integrins an das VCAM-1 und Fibronektin, die auf der Oberfläche von Endothelzellen getragen werden. Lymphozyten und Monozyten nutzen das

β 2- Integrin zur Adhäsion und Migration. Hierzu interagieren sie mit den ICAMs auf Endothelzellen. Die Adhäsionsmoleküle auf den EPCs sowie den Endothelzellen bewirken über zahlreiche Interaktionen miteinander die Adhäsion zwischen beiden Zelltypen im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen. Das Verständnis der Komplexität dieser Wechselwirkungen und der Funktion einzelner Adhäsionsmarker könnte in Zukunft der Medizin neue Targets in der Behandlung der Atherosklerose bieten.

β- Kette	α- Kette	Integrin	Vorkommen	Rezeptor
β 1 (CD29)	α 4 (CD49d)	<u>β1- Integrin</u> (VLA-4)	Leukozyten	VCAM-1 Fibronectin
β 2 (CD18)	α L (CD11a)	<u>β2- Integrin</u> (LFA-1)	v. a. Lymphozyten Monozyten	ICAM (1-3)

Tab. 2: Definition der für die Adhäsion und Migration wichtigen β - Integrine

In der FACS- Analyse zur Bestimmung der Expressionshäufigkeit von Adhäsionsmarkern auf den EPC- Subpopulationen (siehe 3.2.3.2.) wurden β 1- Integrin mit fluoreszenzmarkierten CD49d- Antikörper und β 2- Integrin mit fluoreszenzmarkierten CD11a- Antikörper markiert und gezählt. In den Adhäsions- und Migrationsversuchen (siehe 3.2.4. und 3.2.5.) wurde auf den einzelnen EPC- Subpopulationen jeweils das β 1- Integrin mittels CD29- Antikörper und β 2- Integrin mittels CD18- Antikörper geblockt und die Auswirkungen auf die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der EPC- Subpopulationen untersucht.

3.3. Statistik

Kontinuierliche Variablen wurden auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und vergleichend mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse, two-way-ANOVA (= analysis of variance), getestet, gefolgt von einem paarweise Bonferroni Post-Hoc-Test. Die

Varianzhomogenität wurde mittels Levene Test überprüft. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden von der Statistiksoftware SigmaStat (Version 3.5) geprüft. Alle Datenanalysen wurden verblindet durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1. Expressionsprofil der Adhäsionsmarker auf EPC- Subpopulationen

Die durch Gradientenzentrifugation und immunomagnetische Zellselektion isolierten CD133+/CD34+, CD133+/CD34- und CD133-/CD34- EPC- Subpopulationen wurden mit mehreren fluoreszenzmarkierten Oberflächenantikörpern für die FACS- Analyse gefärbt. Es wurde das Expressionsprofil verschiedener Adhäsionsmarker wie Integrine, Selektine oder ICAMs auf EPC- Subpopulationen untersucht.

Vorarbeiten zeigten in durchflusszytometrischen Versuchen, dass endotheliale Vorläuferzellen mit hochproliferativem Potential β 1- und β 2- Integrine [20, 21] auf ihren Oberflächen tragen.

Das β 2- Integrin (CD11a) konnte mit einer Häufigkeit von 43 ± 3 % auf CD133+/CD34+ EPCs signifikant ($p < 0,001$) mehr gemessen werden als in der Kontrollgruppe (siehe unter 3.2.3.2.).

Das β 1- Integrin (CD49d) konnte auf 32 ± 4 % der CD133+/CD34+ EPCs signifikant nachgewiesen ($p < 0,001$) werden. ICAM (CD54) wurden auf CD133+/CD34+ EPCs signifikant ($p < 0,001$) mehr als die Oberflächenmarker der Kontrollgruppe exprimiert. In Bezug auf alle CD133+/CD34+ EPCs war signifikant nachweisbar, dass P-Selektin (CD62P) ($p = 0,023$) und ein weiteres Integrin (CD11b) ($p = 0,002$) mehr exprimiert wurden als die Isotypenkontrolle

auf derselben EPC-Subpopulation. E-Selektin (CD62E) war auf CD133+/CD34+ EPCs nicht signifikant mehr exprimiert als die Kontrollgruppe. β 2- Integrin (CD11a) wurde signifikant mehr als alle anderen untersuchten Adhäsionsmarker auf der Oberfläche der CD133+/CD34+ EPCs exprimiert. β 1- Integrin (CD49d) wurde signifikant weniger als β 2- Integrin (CD11a) und signifikant mehr als alle übrigen Adhäsionsmarker exprimiert. Bei den CD133+/CD34- EPCs wurde am stärksten β 1- Integrin (CD49d) mit einem Anteil von 54 ± 3 % auf der Oberfläche aller Zellen exprimiert. β 2- Integrin (CD11a) fand sich auf der Oberfläche von 35 ± 2 % aller Zellen. Beide Oberflächenantigene wurden jeweils auf allen CD133+/CD34- EPCs dieser Subpopulation signifikant (jeweils $p < 0,001$) mehr exprimiert als in der Kontrollgruppe. ICAM (CD54) war auf CD133+/CD34- EPCs im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,001$) mehr exprimiert. P-Selektin (CD62P) konnte auf allen EPCs der CD133+/CD34- Subpopulation signifikant mehr ($p = 0,006$) nachgewiesen werden als die Kontrollgruppe. Integrin (CD11b) hatte einen signifikant größeren Anteil ($p = 0,005$) von 7 ± 4 % auf CD133+/CD34- EPCs im Vergleich zur Kontrollgruppe. E-Selektin (CD62E) war in der CD133+/CD34- Subpopulation nicht signifikant mehr exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe. β 1- Integrin (CD49d) war auf den CD133+/CD34- EPCs signifikant mehr als alle restlichen untersuchten Oberflächenmarker exprimiert. β 2- Integrin (CD11a) war im Vergleich zu allen anderen Oberflächenmarker außer β 1- Integrin (CD49d) signifikant mehr exprimiert. Gegenüber β 1- Integrin (CD49d) war es signifikant weniger exprimiert.

β 2- Integrin (CD11a) war mit auf 76 ± 4 % aller Zellen bei CD133-/CD34- EPCs signifikant ($p < 0,001$) mehr nachweisbar im Vergleich zur Kontrollgruppe. β 1- Integrin (CD49d) und ICAM (CD54) waren auf allen Zellen der CD133-/CD34- EPC- Subpopulation signifikant (jeweils $p < 0,001$) mehr exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe. P-Selektin (CD62P) wurde auf 12 ± 1 % der CD133-/CD34- EPCs ($p < 0,001$) signifikant mehr gemessen verglichen mit der Kontrollgruppe derselben Subpopulation. Integrin (CD11b) hatte einen signifikant ($p = 0,007$) größeren Anteil auf der Oberfläche der CD133-/CD34- EPC- Subpopulation als die Kontrollgruppe. Es konnten signifikant mehr Expressionen von E-Selektin (CD62E) auf allen Zellen ($p = 0,031$) der CD133-/CD34- Subpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. β 2- Integrin (CD11a) und β 1- Integrin (CD49d) wurden signifikant mehr exprimiert als alle restlichen untersuchten Adhäsionsmarkern bei CD133-/CD34- EPCs.

Zwischen β 1- Integrin (CD49d) und β 2- Integrin (CD11a) gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expressionshäufigkeit.

β 2- Integrin (CD11a) und β 1- Integrin (CD49d) waren in allen EPC- Subpopulationen signifikant mehr exprimiert als alle restlichen Adhäsionsmarker. Diesen folgten in der Regel das ICAM (CD54). Weitere eher schwach exprimierte Adhäsionsmoleküle auf EPCs stellten CD62P, ein P-Selektin, und CD11b dar. CD11b, eine α M-Einheit, und β 2 (CD18) sind Untereinheiten des Macrophage-1 antigen (Mac-1)- Integrins. Das E-Selektin CD62E wurde auf der Plasmamembranoberfläche der EPC- Subpopulationen kaum getragen. Jedoch wurde in der CD133-/CD34- EPC- Subpopulation auch dieser schwach exprimierte Oberflächenmarker wie alle anderen untersuchten Oberflächenantigenen signifikant mehr exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

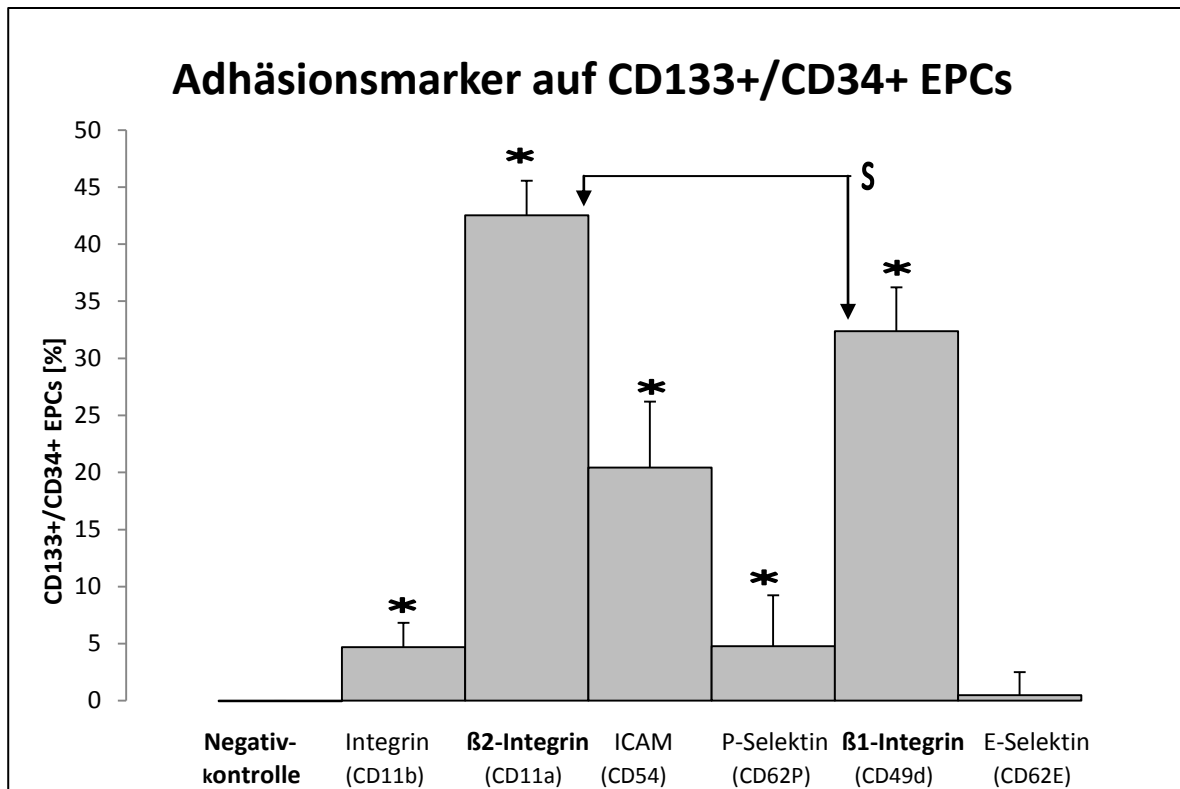


Abb. 3a: Adhäsionsmarkerverteilung auf allen CD133+/CD34+ EPCs

Nach der FACS- Analyse der fluoreszenzmarkierten Zelloberflächen wurde mittels Cellquest Pro Software ausgewertet. Die Säulendiagramme wurden mithilfe von Microsoft® Office Excel 2003 erstellt. Das Säulendiagramm gibt die relative Häufigkeit der verschiedenen Adhäsionsmarker auf CD133+/CD34+ EPCs wieder. β1- und β2- Integrine wurden signifikant mehr als alle restlichen Adhäsionsmarker exprimiert. Ihre Definition kann man Tab.2 unter 3.2.6. entnehmen. Als Negativkontrolle dienten CD133+/CD34+ EPCs des Probanden, die mit Antikörpern gegen Mausantigene behandelt worden waren (n = 6).

* = $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle. D. h. alle Adhäsionsmarker außer E-Selektin (CD62E) signifikant mehr exprimiert gegenüber der Kontrollgruppe.

s = signifikant, d. h. β2- Integrin (CD11a) signifikant mehr als β1- Integrin (CD49d) exprimiert.

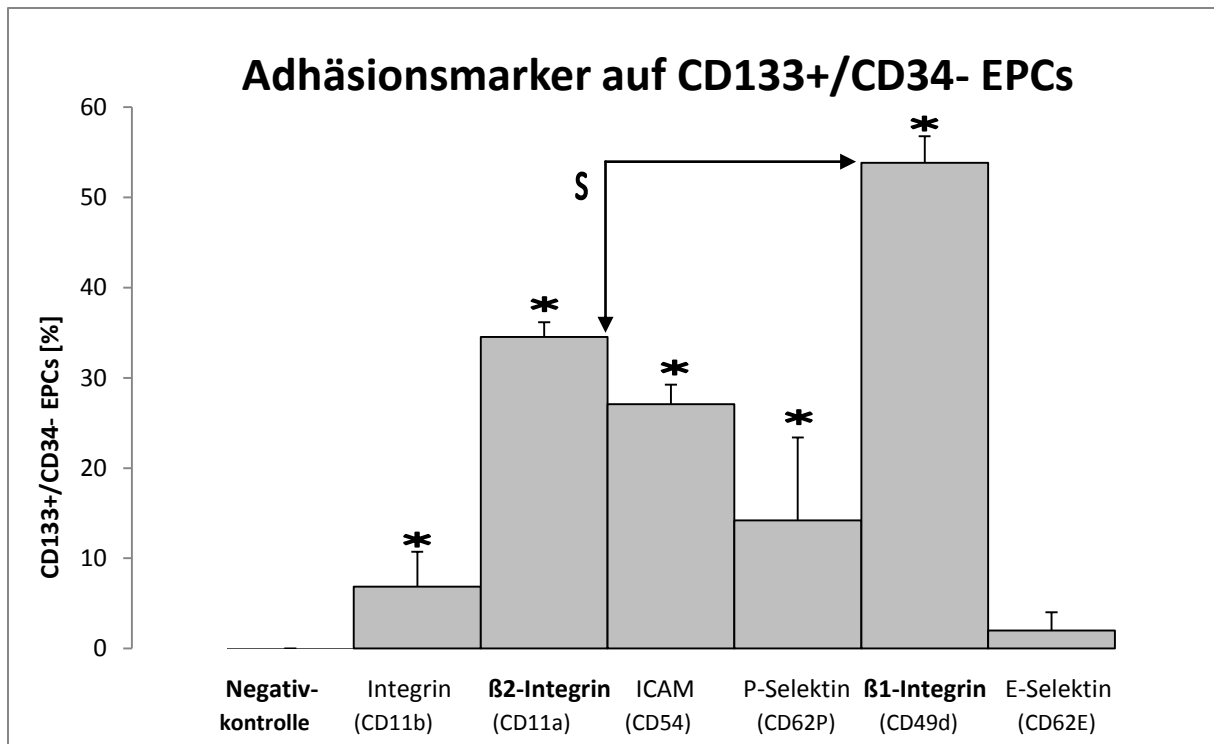


Abb. 3b: Adhäsionsmarkerverteilung auf allen CD133+/CD34- EPCs

Nach der FACS- Analyse der fluoreszenzmarkierten Zelloberflächen wurde mittels Cellquest Pro Software ausgewertet. Die Säulendiagramme wurden mithilfe von Microsoft® Office Excel 2003 erstellt. Das Säulendiagramm gibt die relative Häufigkeit der verschiedenen Adhäsionsmarker auf CD133+/CD34- EPCs wieder. β1- und β2- Integrine wurden signifikant mehr als alle restlichen Adhäsionsmoleküle exprimiert. Ihre Definition kann man Tab.2 unter 3.2.6. entnehmen. Als Negativkontrolle dienten CD133+/CD34- EPCs des Probanden, die mit Antikörpern gegen Mausantigene behandelt worden waren (n = 6).

* = $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle. D. h. alle Adhäsionsmarker außer E-Selektin (CD62E) signifikant mehr exprimiert gegenüber der Kontrollgruppe.

s = signifikant, d. h. β1- Integrin (CD49d) signifikant mehr als β2- Integrin (CD11a) exprimiert.

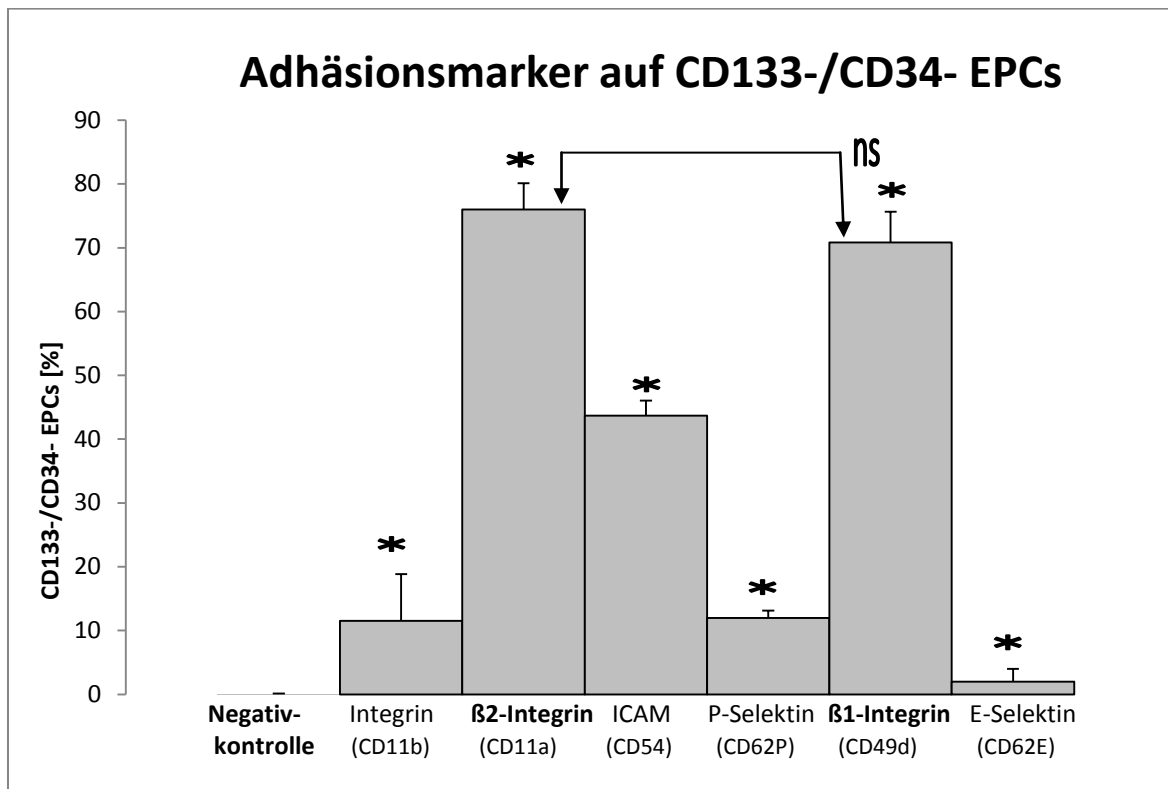


Abb. 3c: Adhäsionsmarkerverteilung auf allen CD133-/CD34- EPCs

Nach der FACS- Analyse der fluoreszenzmarkierten Zelloberflächen wurde mittels Cellquest Pro Software ausgewertet. Die Säulendiagramme wurden mithilfe von Microsoft® Office Excel 2003 erstellt. Das Säulendiagramm gibt die relative Häufigkeit der verschiedenen Adhäsionsmarker auf CD133-/CD34- EPCs wieder. β1- und β2- Integrine wurden signifikant mehr als alle restlichen Adhäsionsmoleküle exprimiert. Ihre Definition kann man Tab.2 unter 3.2.6. entnehmen. Als Negativkontrolle dienten CD133-/CD34- EPCs des Probanden, die mit Antikörpern gegen Mausantigene behandelt worden waren (n = 6).

* $p < 0,05$ gegenüber der Negativkontrolle. D. h. alle Adhäsionsmarker signifikant mehr exprimiert gegenüber der Kontrollgruppe.

ns = nicht signifikant, d. h. β1- Integrin (CD49d) und β2- Integrin (CD11a) ohne signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expressionshäufigkeit.

4.2 Adhäsionsfähigkeit der EPC- Subpopulationen

EPC- Subpopulationen wurden im Folgenden unter physiologischen Flussbedingungen der laminaren Flusskammer in je drei Ansätzen, nämlich ungeblockt als Positivkontrolle sowie mit Antikörper gegen $\beta 1$ - Integrin (Anti-CD29) und mit Antikörper gegen $\beta 2$ - Integrin (Anti-CD18) geblockt auf Adhäsionsfähigkeit hin untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mittels Chemokin SDF-1. SDF-1 fungiert als Promotor der Angiogenese [32, 48]. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass EPCs durch SDF-1 mobilisiert sowohl in vitro als auch in vivo zielgerichtet in ihre Verwendungsorte gelangen [35, 69, 96].

Nach Gabe von Antikörper gegen $\beta 2$ - Integrin adhärten 59 % der CD133+/CD34+ EPCs auf den HUVECs in der laminaren Flusskammer und somit signifikant weniger EPCs im Vergleich zur ungeblockten Kontrollgruppe. Auch bei Gabe von Antikörper gegen $\beta 1$ - Integrin sank die Anzahl signifikant auf 78,11 % gegenüber der Adhäsionen in der ungeblockten Kontrollgruppe. Insgesamt zeigte sich bei Blockade des $\beta 2$ - Integrins eine signifikant stärkere Hemmung der Adhäsion als bei Blockade des $\beta 1$ - Integrins.

Bei den CD133+/CD34- EPCs sank die Anzahl an Adhäsion nach Gabe von Antikörper gegen $\beta 2$ - Integrin gegenüber ungeblockten Zellen der Kontrollgruppe signifikant auf 82 %. Bei Gabe von Antikörper gegen $\beta 1$ - Integrin wurden die Adhäsionen ebenfalls signifikant auf 80,43 % der Kontrollgruppe gehemmt. Insgesamt zeigte sich bei Blockade des $\beta 2$ - Integrins keine stärkere Hemmung der Adhäsion als bei Blockade des $\beta 1$ - Integrins.

Bei CD133-/CD34- Zellen ließ sich die Adhäsionsfähigkeit nur unter Gabe von Antikörper gegen $\beta 2$ - Integrin signifikant auf 85,21 % der Kontrollgruppe reduzieren.

Unter Gabe von Antikörper gegen $\beta 1$ - Integrin sahen wir keine Hemmung der Adhäsionen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend sahen wir in allen drei untersuchten EPC- Subpopulationen eine signifikante Hemmung der Adhäsionsfähigkeit durch die Blockade des $\beta 2$ - Integrins. Abgesehen von CD133-/CD34- Zellen führte auch die Blockade des $\beta 1$ - Integrins zu einer signifikanten Hemmung der Adhäsionen. Bei CD133+/CD34+ EPCs zeigte die Blockade des

β 2- Integrins eine signifikant stärkere Hemmung der Adhäsion als die Blockade des β 1- Integrins.

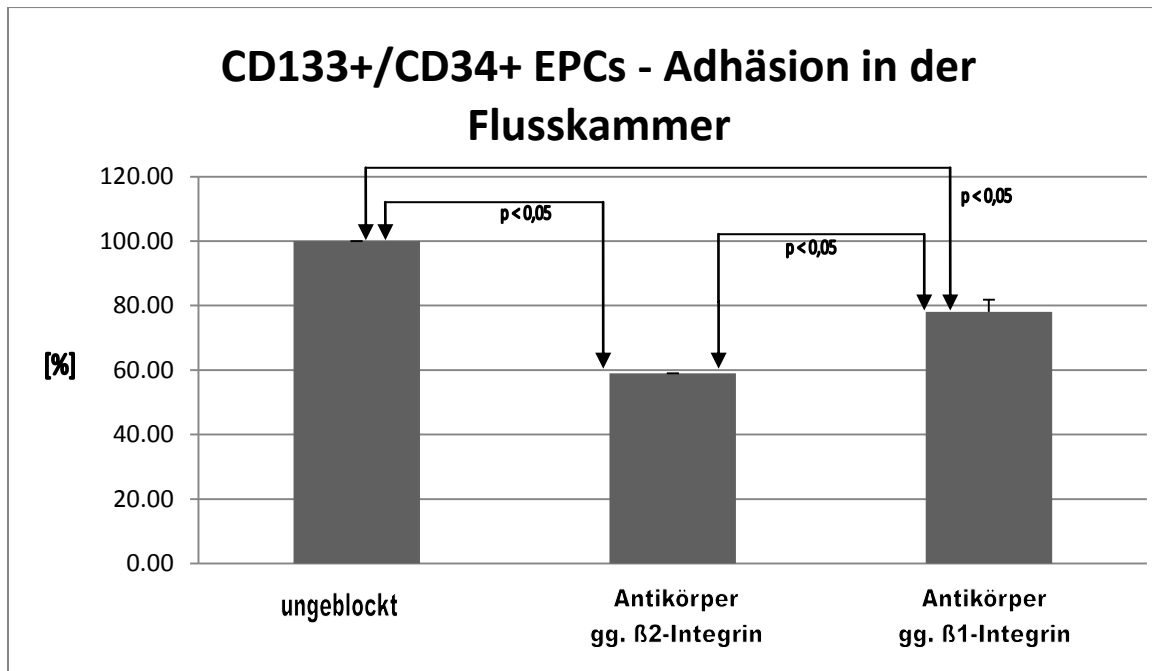


Abb. 4a: Adhäsion unter physiologischen Bedingungen in der Flusskammer Antikörper- geblockter und ungeblockter CD133+/CD34+ EPCs

Die CD133+/CD34+ EPCs wurden in jeweils drei Ansätzen (Säulendiagramm von links nach rechts: ungeblockt, mit Antikörper gegen β 2- Integrin sowie gegen β 1- Integrin geblockt – siehe Definition β - Integrine Tab. 2 unter 3.2.6.) in einer laminaren Flusskammer über mit TNF- α und HUVEC- Nährmedium voraktiviertem HUVEC- Zellrasen hinwegperfundiert. Mittels Videoaufzeichnung wurden Adhäsionen gezählt. Als ungeblockt gekennzeichnet sieht man die Kontrollgruppe. Hierbei handelt es sich um CD133+/CD34+ EPCs, die ungeblockt ungehindert auf dem HUVEC- Zellrasen adhären konnten. Die Anzahl ihrer Adhäsionen soll die maximale Anzahl an Adhäsionen dieser Subpopulation widerspiegeln. Die Werte an der y- Achse sind Prozentzahlen, die die relative Häufigkeit der adhärenierten EPCs unter Blockade mit Antikörper gegen β 1- sowie β 2- Integrin in Bezug auf die ungeblockte Kontrollgruppe wiedergeben. n = 6.

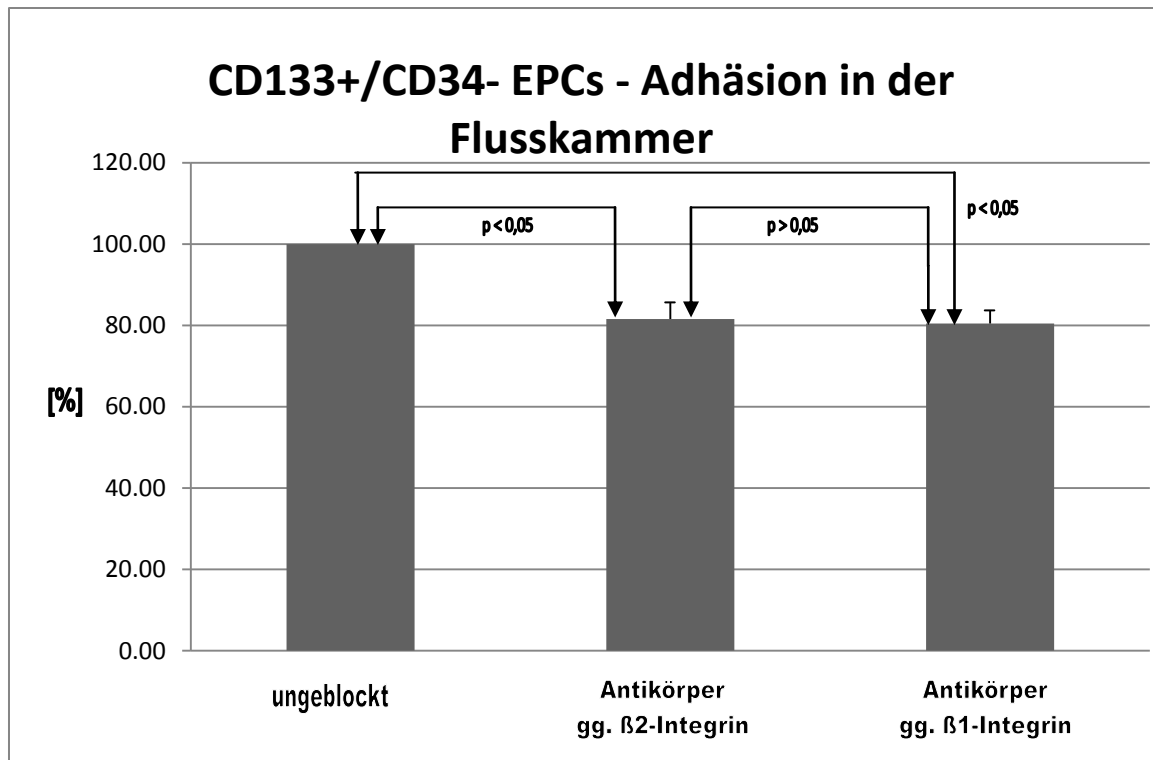


Abb. 4b: Adhäsion unter physiologischen Bedingungen in der Flusskammer Antikörper- geblockter und ungeblockter CD133+/CD34- EPCs

Die CD133+/CD34- EPCs wurden in jeweils drei Ansätzen (Säulendiagramm von links nach rechts: ungeblockt, mit Antikörper gegen β 2- Integrin sowie gegen β 1- Integrin geblockt – siehe Definition β - Integrine Tab. 2 unter 3.2.6.) in einer laminaren Flusskammer über mit TNF- α und HUVEC- Nährmedium voraktiviertem HUVEC- Zellrasen hinwegperfundiert. Mittels Videoaufzeichnung wurden Adhäsionen gezählt. Als ungeblockt gekennzeichnet sieht man die Kontrollgruppe. Hierbei handelt es sich um CD133+/CD34- EPCs, die ungeblockt ungehindert auf dem HUVEC- Zellrasen adhären konnten. Die Anzahl ihrer Adhäsionen soll die maximale Anzahl an Adhäsionen dieser Subpopulation widerspiegeln. Die Werte an der y- Achse sind Prozentzahlen, die die relative Häufigkeit der adhärenierten EPCs unter Blockade mit Antikörper gegen β 1- sowie β 2- Integrin in Bezug auf die ungeblockte Kontrollgruppe wiedergeben. n = 6.

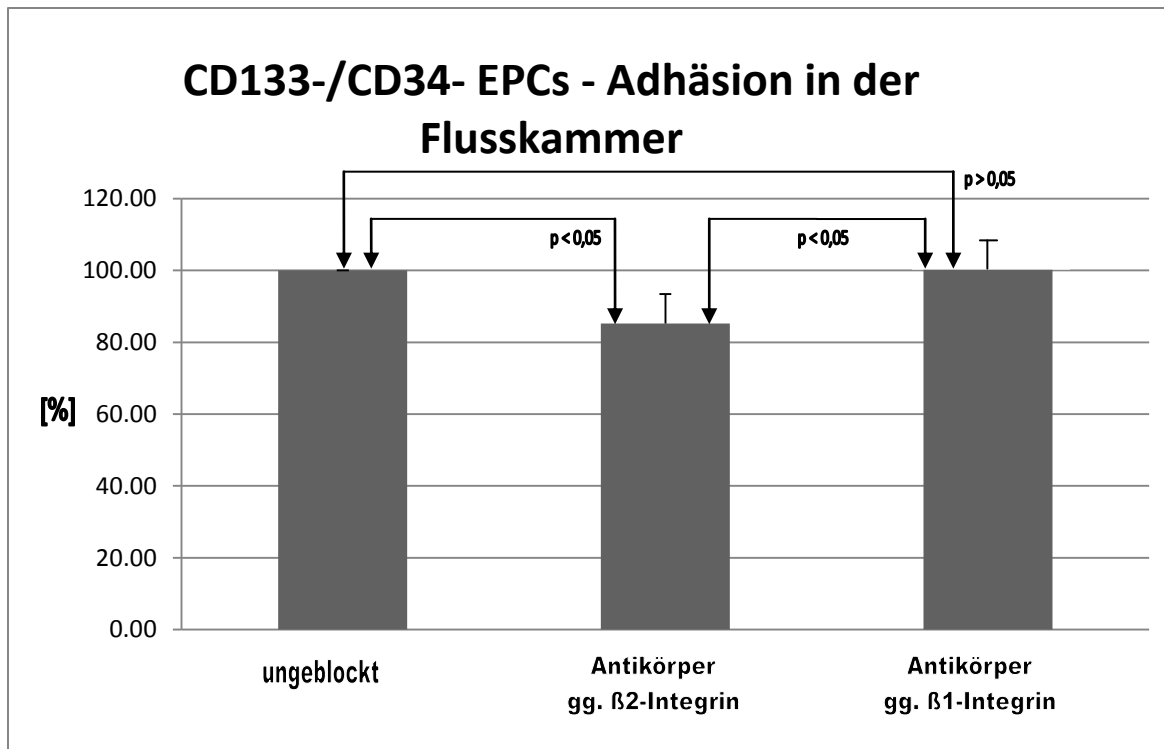


Abb. 4c: Adhäsion unter physiologischen Bedingungen in der Flusskammer Antikörper- geblockter und ungeblockter CD133-/CD34- EPCs

Die CD133-/CD34- EPCs wurden in jeweils drei Ansätzen (Säulendiagramm von links nach rechts: ungeblockt, mit Antikörper gegen β 2- Integrin sowie gegen β 1- Integrin geblockt – siehe Definition β - Integrine Tab. 2 unter 3.2.6.) in einer laminaren Flusskammer über mit TNF- α und HUVEC- Nährmedium voraktiviertem HUVEC- Zellrasen hinwegperfundiert. Mittels Videoaufzeichnung wurden Adhäsionen gezählt. Als ungeblockt gekennzeichnet sieht man die Kontrollgruppe. Hierbei handelt es sich um CD133-/CD34- EPCs, die ungeblockt ungehindert auf dem HUVEC- Zellrasen adhären konnten. Die Anzahl ihrer Adhäsionen soll die maximale Anzahl an Adhäsionen dieser Subpopulation widerspiegeln. Die Werte an der y- Achse sind Prozentzahlen, die die relative Häufigkeit der adhärenierten EPCs unter Blockade mit Antikörper gegen β 1- sowie β 2- Integrin in Bezug auf die ungeblockte Kontrollgruppe wiedergeben. n = 6.

4.3. Migrationsfähigkeit der EPC- Subpopulationen

Die EPC- Subpopulationen wurden wie bei der Adhäsion jeweils mit Antikörpern gegen β 1- (CD29) und gegen β 2- (CD18) Integrine geblockt sowie zur Kontrolle ungeblockt auf ein Migrationsassay gegeben. Außerdem wurden alle Ansätze wieder wie bei der Adhäsion unter dynamischen Bedingungen mit dem Chemokin SDF-1 stimuliert. Hiermit wurde die qualitative Bedeutung der durchflusszytometrisch ermittelten quantitativ wichtigen Adhäsionsmarker hinsichtlich der Migration von Zellen überprüft.

Die Anzahl migrierter CD133+/CD34+ Zellen betrug ungeblockt $25,17 \pm 4,79$ Zellen. Nach Gabe von Antikörper gegen β 2- Integrin sank die Anzahl der Migrationen signifikant auf $81,46 \pm 3,39$ %. Die Gabe von Antikörper gegen β 1- Integrin führte zu keiner signifikanten Hemmung der Migration.

Bei den CD133+/CD34- Zellen migrierten ungeblockt $25,67 \pm 7,5$ Zellen. Weder die Blockade mit Antikörper gegen β 1- Integrin noch die mit Antikörper gegen β 2- Integrin zeigten einen signifikanten Effekt auf die Migration.

Bei CD133-/CD34- Zellen migrierten ungeblockt $17,5 \pm 5,99$ Zellen. Nach Blockade mit Antikörpern gegen β 1- und β 2- Integrine kam es zu keiner Abnahme der Migration.

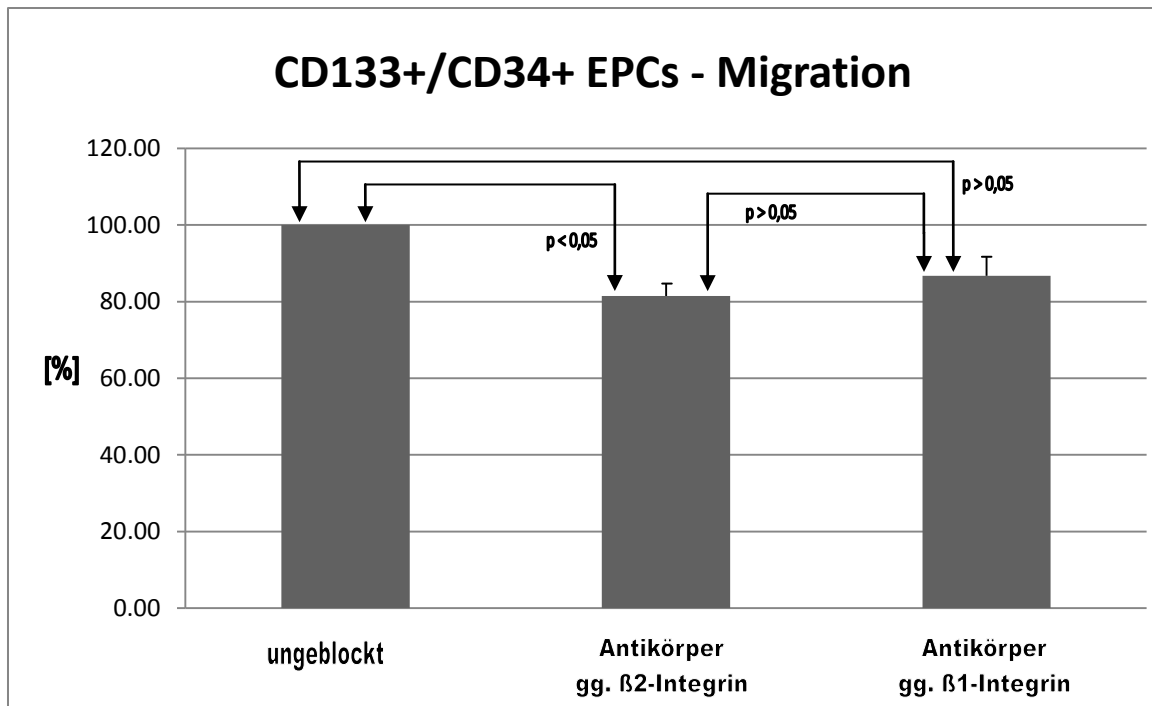


Abb. 5a: Migrationsstreben Antikörper- geblockter und ungeblockter CD133+/CD34+ EPCs

CD133+/CD34+ EPCs migrierten in jeweils drei Ansätzen (Säulendiagramm von links nach rechts: ungeblockt, mit Antikörper gegen β 2- Integrin geblockt, mit Antikörper gegen β 1- Integrin geblockt – siehe Definition β -Integrine Tab. 2 unter 3.2.6.) durch spezielle PET- Membrane. Anschließend wurden die migrierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Die „ungeblockt“ migrierten Zellen stellten die Kontrollgruppe dar. Diese konnten ohne Blockade durch Antikörper ungehindert migrieren. Unter Hemmung der Migration durch Antikörper gegen β 1- sowie β 2- Integrine wurde die Anzahl migrierter EPCs ausgewertet. n = 6.

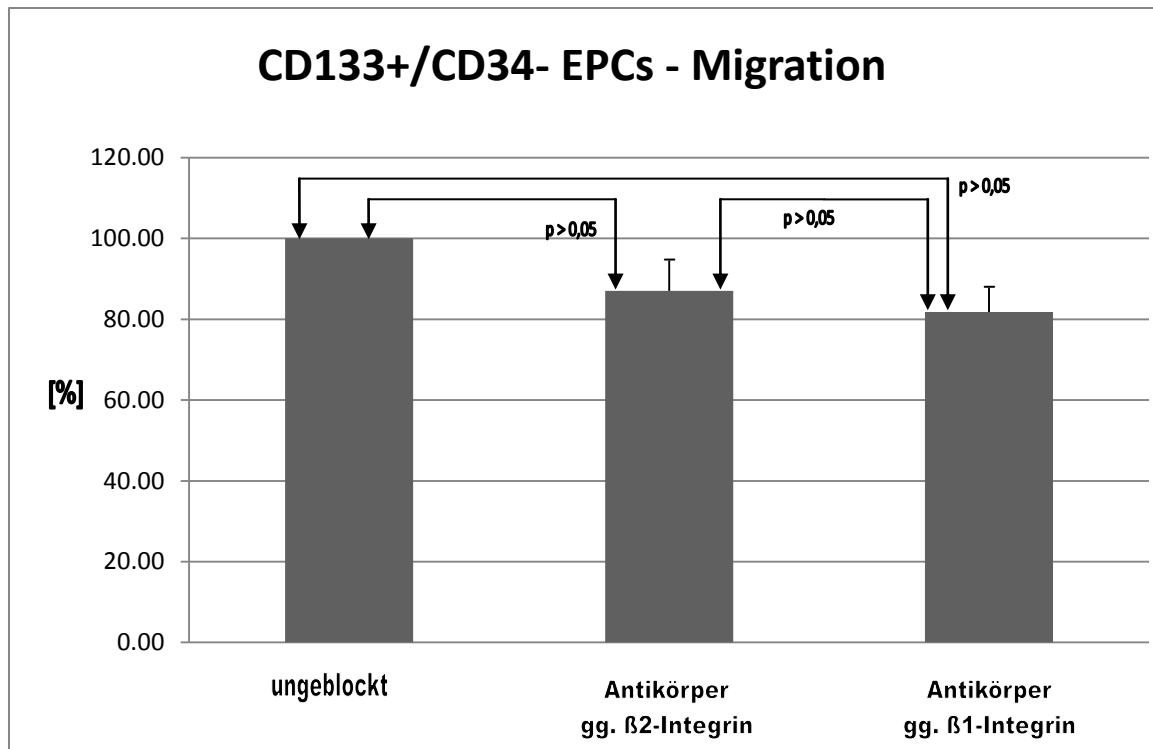


Abb. 5b: Migrationsstreben Antikörper- geblockter und ungeblockter CD133+/CD34- EPCs

CD133+/CD34- EPCs migrierten in jeweils drei Ansätzen (Säulendiagramm von links nach rechts: ungeblockt, mit Antikörper gegen $\beta 2$ - Integrin geblockt, mit Antikörper gegen $\beta 1$ - Integrin geblockt – siehe Definition β -Integrine Tab. 2 unter 3.2.6.) durch spezielle PET- Membrane. Anschließend wurden die migrierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Die „ungeblockt“ migrierten Zellen stellten die Kontrollgruppe dar. Diese konnten ohne Blockade durch Antikörper ungehindert migrieren. Unter Hemmung der Migration durch Antikörper gegen $\beta 1$ - sowie $\beta 2$ - Integrine wurde die Anzahl migrierter EPCs ausgewertet. $n = 6$.

5. Diskussion

5.1. Verteilung von β 1- und β 2- Integrinen auf den EPC- Subpopulationen

Alle Subpopulationen besitzen ein individuelles Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen. Vorarbeiten zeigten in durchflusszytometrischen Versuchen, dass endotheliale Vorläuferzellen mit hochproliferativem Potential die Adhäsionsmarker β 1- und β 2- Integrine [21] bzw. LFA-1 und VLA-4 [20] auf ihren Oberflächen tragen. Ihre Rezeptoren wurden auf Endothelzellen des Knochenmarks einer Maus untersucht. Es war auffällig, dass ICAM-1 und VCAM-1 bei Zytokingabe anstiegen [21]. Ihre endothelialen Liganden ICAM-1 und VCAM-1 lassen sich auch in ischämischem Gewebe wiederfinden [20].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die β 1- und β 2- Integrine einen besonderen Stellenwert im Expressionsprofil der einzelnen EPC- Subpopulationen CD133+/CD34+, CD133+/CD34- und CD133-/CD34- einnehmen. Sie sind auf allen EPC- Subpopulationen signifikant mehr exprimiert ($p < 0,05$) als in den Kontrollgruppen. Auch im Vergleich zu allen restlichen untersuchten Oberflächenmarkern finden sich beide Adhäsionsmarker signifikant mehr auf der Oberfläche der drei untersuchten EPC- Subpopulationen.

Neben α L (CD11a) stellt α M (CD11b) einen ebenfalls mit dem β 2- Integrin [50, 81] gekoppelten Oberflächenmarker dar. Vorarbeiten kamen zu dem Ergebnis, dass diese α M- Untereinheit des Mac-1-Integrins direkt in die Adhäsion und Ausbreitung von Zellen involviert ist, jedoch ohne die Präsenz von der β 2-Untereinheit die Zellmigration nicht vermitteln kann [73]. Dieses Antigen ist in das Komplementsystem involviert [1], übernimmt somit auch antibakterielle Funktionen neben Adhäsion und Migration und kommt damit zusammenhängend meistens auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise Neutrophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen vor [73].

Das ICAM-1 (CD54) präsentiert sich als weiteren stark exprimierten Adhäsionsmarker auf den drei EPC- Subpopulationen. Bei ihnen handelt es sich um endotheliale Liganden, die sowohl mit der β 2- [37, 47, 53] als auch mit α L-Kette [53, 71, 99] des LFA-1-Integrins [11, 68, 79] interagieren. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 ermöglicht Immunzellen die Rekrutierung bei Entzündung [22] und Transmigration durch das Endothelgewebe [98].

Das E-Selektin (CD62E) wurde auf den EPC- Subpopulationen kaum exprimiert. Dieses stellt ein auf Endothelzelloberflächen befindliches Selektin dar. Das CD62P stellt ein weiteres Selektin dar. Es wird eigentlich nur auf die Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen zugewiesen. Beide Selektine binden am Gefäßendothel vorbeierollende EPCs [43].

5.2. Einfluss der Blockade von β 1- und β 2- Integrinen auf Adhäsion und Migration

Die Migrations- und Adhäsionsfähigkeiten der CD133+/CD34+, CD133+/CD34- und CD133-/CD34- EPC- Subpopulationen wurden mittels Antikörpergaben gegen β 1- sowie β 2- Integrine untersucht. Beide Integrine wurden auf allen drei EPC- Subpopulationen unter allen untersuchten Adhäsionsmolekülen am häufigsten exprimiert.

Vorarbeiten zeigten, dass die Gabe von Antikörpern gegen β 1- und β 2- Integrine sowohl einzeln als auch gegen beide gleichzeitig die Anzahl adhärrierender und migrierender Zellen senkte, wobei bei gleichzeitiger Blockade beider Oberflächenstrukturen die Anzahl adhärrierender und migrierender Zellen am stärksten abfiel [21]. Daraus wurde gefolgert, dass sowohl β 1- als auch β 2- Integrine in vasoendothelialer Adhäsion und transendothelialer Migration von hochproliferativen endothelialen Vorläuferzellen beteiligt sind [21]. Auch weitere Vorarbeiten deuten daraufhin, dass der Block mit Antikörper gegen β 1- und β 2- Integrine die Adhäsion und Migration hemmt [20].

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die β 1- und β 2- Integrine in den einzelnen EPC- Subpopulation unterschiedliche Verteilung und Bedeutung hinsichtlich der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit präsentierten.

Die Adhäsion der EPCs an das Gefäßendothel ist β 2- Integrin vermittelt [43]. Unter Blockade des β 2- Integrins mittels Antikörper kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Adhäsion unter physiologischen Bedingungen bei allen drei untersuchten EPC- Subpopulationen. Auch in Vorarbeiten konnte eine Abnahme der EPC- Adhäsionsfähigkeit bei Blockade des β 2- Integrins gezeigt werden [31]. Allein bei der CD133+/CD34+ Subpopulation kommt es auch zu einer signifikanten Abnahme der Migration. In Vorarbeiten wurde das β 1- Integrin durch

eine Hyperhomocysteinämie gehemmt. Dies führte in CD34+ Zellen zu einer Reduktion der Adhäsion und Migration [60].

Die Rolle des β 1- Integrins im Adhäsionsverhalten ist nicht hinreichend geklärt. In Vorarbeiten hatte die Blockade des β 1- Integrins eine Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der EPCs gezeigt [43]. In dieser Arbeit wurde der Effekt dieses Integrins auf die Adhäsionsfähigkeit der EPC- Subpopulationen untersucht. Hierbei führte die Blockade des β 1- Integrins zu einer signifikanten Abnahme der Adhäsionsfähigkeit bei den CD133+/CD34+ und CD133+/CD34- Subpopulationen ohne Einfluss auf die Migration.

Die FACS- Analyse hatte bei den CD133+/CD34+ EPCs signifikant mehr Expression des β 2- Integrins als β 1- Integrin gezeigt. Hierzu passend kam es bei Blockade des β 2- Integrins zu signifikant mehr Hemmung der Adhäsion im Vergleich zu Blockade des β 1- Integrins. Die Migrationsfähigkeit wurde nur durch Blockade des β 2- Integrins gehemmt. Bei den CD133+/CD34- EPCs hatten Vorarbeiten gezeigt, dass diese EPC- Subpopulation bei der Adhäsion stärker von β 1- Integrin abhängig war als die CD133+/CD34+ EPCs [25]. β 1- Integrin fand sich in der FACS- Analyse signifikant mehr als β 2- Integrin auf der Oberfläche dieser Subpopulation und eine Blockade des β 1- Integrins führte zu einer signifikanten Hemmung der Adhäsion. Bei der CD133-/CD34- Subpopulation führte die Blockade des β 2- Integrins zu einer signifikanten Hemmung der Adhäsion ohne funktionellen Einfluss auf die Migration. Eine Blockade des β 1- Integrins zeigte keinen Effekt auf die Adhäsion oder Migration.

Integrine aktivieren Signalwege über Interaktion mit anderen Proteinen. Sowohl die β - als auch die α - Untereinheiten der Integrine initiieren über verschiedene Bindungspartner unterschiedliche Signalwege, die bislang nicht hinreichend geklärt sind. In einigen Fällen zeigte die Blockade der β - Integrine wie oben aufgeführt keinen Effekt auf die Adhäsion oder Migration. Hieraus resultiert die Frage, über welches Integrin oder Adhäsionsmolekül die Adhäsion und Migration vermittelt wird. Möglicherweise könnten hier weniger exprimierte Adhäsionsmoleküle wie ICAM (CD54) oder P-Selektin (CD62P) für die Adhäsion und Migration der EPCs funktionell wichtiger als angenommen sein.

Die Interaktion der Integrine mit ihren endothelialen Liganden ist ein entscheidender Prozess in Hinsicht auf die Adhäsion der EPCs an das Gefäßendothel und die Wanderung durch das Endothelgewebe hindurch. Das Verstehen insbesondere der Bedeutung von Integrinen wie insbesondere β 1- und β 2- Integrine könnte zur Förderung der Rekrutierung von

gefäßneubildenden EPCs an den Orten der Ischämie führen. In Vorarbeiten konnte über eine Überexpression des $\beta 1$ - Integrins die Angiogenese in einem Tierexperiment stimuliert werden [29]. Die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit könnten über auf bestimmte Integrine in den EPC- Subpopulationen gerichtete ähnliche Manipulationen zu neuer Therapie der Atherosklerose beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Arnaout M, Todd R, Dana N, Melamed J, Schlossman S, Colten H (1983) Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol). J Clin Invest 72 (1): 171–179
- [2] Ärzteblatt (2011) WHO: Chronische Erkrankungen die häufigste Todesursache
- [3] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circulation Research 85(3): 221-228
- [4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzensbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275: 964-967
- [5] Ascherio A, Willett WC (1995) New directions in dietary studies of coronary heart disease. Journal of Nutrition 125: 647S-655S
- [6] Ayad S, Boot-Hanford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA (1998) The Extracellular Matrix (Facts Book). Academic Press (Harcourt Brace & Company, Publishers), Printed in Great Britain, S. 3 ff
- [7] Beaglehole R, Magnus P (2002) The search for new risk factors for coronary heart disease: occupational therapy for epidemiologists? Int J Epidemiol. 31(6): 1117-1122
- [8] Bethesda: NHLBI morbidity and mortality chartbook. National Heart, Lung, and Blood Institute, May 2002

- [9] Brown MS, Ho YK, Goldstein JL (1980) The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem* 255(19): 9344-9352
- [10] Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 203: 2201–2213
- [11] Chidlow JH Jr, Glawe JD, Alexander JS, Kevil CG (2010) VEGF₁₆₄ differentially regulates neutrophil and T cell adhesion through ItgaL- and ItgaM-dependent mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299(6): G1361-1367
- [12] Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR (1987) Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol.* 15(1): 10-17
- [13] Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE, Hamm HE (2006) Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* 107 (7): 2736–2744
- [14] Clever YP (2007) Die Bedeutung der monozytären Rac1 GTPase und der glattmuskulären Integrin-Linked Kinase für die Pathogenese der Atherosklerose. Doktorarbeit: 52-53
- [15] Coligan J, Kruisbeck A, Margulies D, Shevach E, Strober W. (2005). *Current Protocols. Immunology.* John Wiley and Sons Inc, New York
- [16] Cotran, Kumar, Collins. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* Philadelphia
- [17] Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kürzinger K, Springer TA (1981) Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (7): 4535–4539
- [18] Di Stefano R, Felice F, Pini S, Mazzotta G, Bovenzi FM, Bertoli D, Abelli M, Borelli L, Cardini A, Lari L, Gesi C, Muccignat A, Oligeri C, Michi P, Balbarini A (2014) Impact of depression on circulating endothelial progenitor cells in patients with acute coronary syndromes: a pilot study. *J Cardiovasc Med. (Hagerstown)* 15(4): 353-359

- [19] Döring A, Wild M, Vestweber D, Deutsch U, Engelhardt B (2007) E- and P-selectin are not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 and SJL Mice. *J. Immunol.* 179(12): 8470-8479
- [20] Duan H, Cheng L, Sun X, Wu Y, Hu L, Wang J, Zhao H, Lu G (2006) LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue. *Thromb Haemost.* 96(6): 807-815
- [21] Duan HX, Lu GX, Cheng LM (2008) LFA-1 and VLA-4 involved in vasoendothelial adhesion and transendothelial migration of human high proliferative potential endothelial progenitor cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 16(3): 671-675
- [22] Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, Couraud PO (1999) ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion. *J. Immunol.* 163 (2): 668–674
- [23] Evans EA, Calderwood DA (2007) Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* 316: 1148-1153
- [24] Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R (1999) Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation.* 99: 44–52.
- [25] Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N (2006) CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res* 17; 98(3): e20-5
- [26] Friedrich EB, Werner C, Walenta K, Böhm M, Scheller B (2009) Role of extracellular signal-regulated kinase for endothelial progenitor cell dysfunction in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol.* 104(5): 613-620
- [27] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 95: 3106–3112
- [28] Gimbrone MA Jr (1999) Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol.* 155(1): 1-5
- [29] Goto K, Takemura G, Takahashi T, Okada H, Kanamori H, Kawamura I, Watanabe T, Morishita K, Tsujimoto A, Miyazaki N, Ushikoshi H, Kawasaki M, Mikami A, Kosai K, Minatoguchi S (2016) Intravenous administration of endothelial colony-forming cells

- overexpressing integrin $\beta 1$ augments angiogenesis in ischemic legs. *Stem Cells Transl Med.* 5(2): 218-226
- [30] Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S (2003) Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 996: 141–151
- [31] Hayakawa K, Pham LD, Arai K, Lo EH (2014) Reactive astrocytes promote adhesive interactions between brain endothelium and endothelial progenitor cells via HMGB1 and beta-2 integrin signaling. *Stem Cell Res.* 12(2): 531-538
- [32] Heidemann J, Ogawa H, Rafiee P, Lügering N, Maaser C, Domschke W, Binion DG, Dwinell MB (2004) Mucosal angiogenesis regulation by CXCR4 and its ligand CXCL12 expressed by human intestinal microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 286(6): G1059-1068
- [33] Herold G und Mitarbeiter (2009) *Innere Medizin*
- [34] Hristov M, Erl W, Weber PC (2003) Endothelial progenitor cells: Isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 13(5): 201-206
- [35] Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C (2007) Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost* 98: 274-277
- [36] Hsu WY, Chao YW, Tsai YL, Lien CC, Chang CF, Deng MC, Ho LT, Kwok CF, Juan CC (2011) Resistin induces monocyte-endothelial cell adhesion by increasing ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via p38MAPK-dependent pathway. *J Cell Physiol.* 226 (8): 2181-2188
- [37] Huang C, Springer TA (1995) A binding interface on the I domain of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J. Biol. Chem.* 270 (32): 19008–19016
- [38] Humphries MJ (2000) Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* 28, Nr. 4: 311–339
- [39] Humphries MJ, Sheridan J, Mould AP, Newham P (1995) Mechanisms of VCAM-1 and fibronectin binding to integrin alpha 4 beta 1: implications for integrin function and rational drug design. *Ciba Found. Symp.* 189: 177–191
- [40] Hynes R (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687
- [41] Joussen AM, Kirchhof B, Gottstein C (2003) Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Der Ophthalmologe* Band 100, Nr. 4: 284–291

- [42] Jung C, Fischer N, Fritzenwanger M, Thude H, Ferrari M, Fabris M, Brehm BR, Barz D, Figulla HR (2009) Endothelial progenitor cells in adolescents: impact of overweight, age, smoking, sport and cytokines in younger age. *Clin Res Cardiol.* 98(3): 179-188
- [43] Kaiser R, Friedrich D, Chavakis E, Böhm M, Friedrich EB (2012) Effect of hypoxia on integrin-mediated adhesion of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 16(10): 2387-2393
- [44] Karp G (2005) *Molekulare Zellbiologie.* Springer, 327–329
- [45] Keymel S, Kalka C, Rassaf T, Yeghiazarians Y, Kelm M, Heiss C (2008) Impaired endothelial progenitor cell function predicts age-dependent carotid intimal thickening. *Basic Res Cardiol.* 103(6): 582-586
- [46] Kleinbongard P, Weber AA (2008) Impaired interaction between platelets and endothelial progenitor cells in diabetic patients. *Basic Res Cardiol* 103: 569-711
- [47] Kotovuori A, Pessa-Morikawa T, Kotovuori P, Nortamo P, Gahmberg CG (1999) ICAM-2 and a peptide from its binding domain are efficient activators of leukocyte adhesion and integrin affinity. *J. Immunol.* 162 (11): 6613–6620
- [48] Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W (2005) CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.* 65(2): 465-472
- [49] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R (2007) *Robbins Basic Pathology* (8th ed.). Saunders Elsevier. S. 348-351
- [50] Larson R, Springer T (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114: 181–217
- [51] Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105(9): 1135-1143
- [52] Liu T, Liu X, Xiang J, Zou P, Zhou J, Chen Y, Yu D, Li C (1997) Study on the relationship between the expression of adhesion molecules and the invasiveness of acute myeloid leukemia cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 18 (1): 29-31
- [53] Lu C, Takagi J, Springer TA (2001) Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J. Biol. Chem.* 276 (18): 14642–14648

- [54] Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 9448–9453
- [55] Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 88(3):287-298
- [56] N. N. (1998) The International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease: Coronary heart disease: Reducing the risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 8, 205-271
- [57] Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382: 635–637
- [58] Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Hotta T, Kato S (1999) Ex vivo generation of CD34+ cells from CD34- hematopoietic cells. *Blood.* 94: 4053–4059
- [59] Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods* 42: 97-114
- [60] Nelson J, Wu Y, Jiang X, Berretta R, Houser S, Choi E, Wang J, Huang J, Yang X, Wang H, (2015) Hyperhomocysteinemia suppresses bone marrow CD34+/VEGF receptor 2+ cells and inhibits progenitor cell mobilization and homing to injured vasculature-a role of β 1- integrin in progenitor cell migration and adhesion. *FASEB J.* 29(7): 3085-3099
- [61] Oerlemans MI, Goumans MJ, van Middelaar B, Clevers H, Doevendans PA, Sluijter JP (2010) Active Wnt signaling in response to cardiac injury. *Basic Res Cardiol* 105: 631-641
- [62] Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafiropoulos V, Scott LM, Harlan JM (2001) Synergistic mobilization of hemopoietic progenitor cells using concurrent beta1 and beta2 integrin blockade or beta2-deficient mice. *Blood* 97 (5): 1282-1288
- [63] Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA (1989) Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting. *Fundamental Immunology*: 781-802
- [64] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human

- CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 95: 952–958
- [65] Philipp Christen, Rolf Jaussi (2004) *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten* (Springer-Lehrbuch). Springer, 379ff.
- [66] Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL (2001) Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*. 115(1): 186-194
- [67] Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL (2003) Peripheral blood “Endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 107: 1164–1169
- [68] Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *Journal of Immunology* 137 (4): 1270–1274
- [69] Sainz J, Sata M (2007) CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 263-265
- [70] Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW, Weber C (2008) Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic Res Cardiol* 103: 69-77
- [71] Shimaoka, Motomu, Xiao Tsan, Liu JH, Yang Y, Dong Y, Jun CD, McCormack A, Zhang R, Joachimiak A, Takagi J, Wang JH, Springer TA (2003) Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* 112 (1): 99–111.
- [72] Shmelkov SV, St. Clair R, Lyden D, Rafii S (2005) AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 37: 715–719
- [73] Solovjov D, Pluskota E, Plow E (2005) Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem* 280 (2): 1336–1345
- [74] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 361: 45–46
- [75] Statistisches Bundesamt - Todesursachen in Deutschland
- [76] Staunton DE, Dustin ML, Springer TA (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339 (6219): 61–64

- [77] Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, Bigalke B, Mueller I, Schumm M, Schaefer I, Seizer P, Kraemer BF, Siegel-Axel D, May AE, Lindemann S, Gawaz M (2008) Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 117 (2): 206-215.
- [78] Sugo A, Nakajima S, Kurata T, Mokuno H, Daida H, Yamaguchi H (1997) Ultrasonographic assessment of carotid atherosclerosis emphasizing the variety of intimal-medial thickness and the relationship with coronary risk factors. *J Cardiol.* 30(6): 321-329
- [79] Svensson L, McDowall A, Giles KM, Stanley P, Feske S, Hogg N (2010) Calpain 2 controls turnover of LFA-1 adhesions on migrating T lymphocytes. *PLoS One* 5(11): e15090
- [80] Thews G (2007) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: 140 Tabellen.* Wiss. Verlag-Ges., Stuttgart
- [81] Todd R (1996) The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3). *J. Clin. Invest.* 98 (1): 1–2
- [82] Todesursachenstatistik: Gesundheitsberichterstattung des Bundes
- [83] Urzainqui A, Martínez del Hoyo G, Lamana A, de la Fuente H, Barreiro O, Olazabal IM, Martin P, Wild MK, Vestweber D, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F (2007) Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol.* 179(11): 7457-7465
- [84] Varga G, Balkow S, Wild MK, Stadtbauer A, Krummen M, Rothoeft T, Higuchi T, Beissert S, Wethmar K, Scharffetter-Kochanek K, Vestweber D, Grabbe S (2007) Active Mac-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T cell activation. *Blood* 109(2):661-669
- [85] Vestweber D, Wild MK (2008) A new player in lymphocyte homing. *Nature Immunol.* 9(4) 347-348
- [86] Walenta K, Bettink S, Böhm M, Friedrich EB (2011) Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations. *BasicRes Cardiol.* 106(2): 299-305

- [87] Walenta K, Friedrich EB, Sehnert F, Werner N, Böhm M, Nickenig G (2005) *In vitro* differentiation characteristics of cultured human mononuclear cells – implications for endothelial progenitor cell biology. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(2), 476-482
- [88] Walenta K, Schwarz V, Schirmer SH, Kindermann I, Friedrich EB, Solomayer EF, Sliwa K, Labidi S, Hilfiker-Kleiner D, Böhm M (2012) Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 33(12): 1469-1479
- [89] Wein M, Sterbinsky SA, Bickel CA, Schleimer RP, Bochner BS (1995) Comparison of human eosinophil and neutrophil ligands for P-selectin: ligands for P-selectin differ from those for E-selectin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 12 (3): 315–319
- [90] Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G (2003) Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *CircRes* 93 (2): e17-24
- [91] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353(10): 999-1007
- [92] Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, Walenta K, Nickenig G (2007) Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*. 102(6): 565-571
- [93] Wild MK - Die Adhäsionskaskade: Kontakte zwischen Leukozyten und Endothelzellen
molekulare Biomedizin Abteilung Vaskuläre Zellbiologie, Münster
- [94] Wood D, De Backer G, Faergeman O (1998) Prevention of coronary heart disease in clinical practice - Recommendations of the second joint task force of European and other Societies on Coronary prevention. *Eur Heart J* 19, 1434-1503
- [95] Yakubenia S, Frommhold D, Schölch D, Hellbusch CC, Körner C, Petri B, Jones C, Ipe U, Bixel MG, Krempien R, Sperandio M, Wild MK (2008) Leukocyte trafficking in a mouse model for leukocyte adhesion deficiency II/congenital disorder of glycosylation IIc. *Blood*. 112(4):1472-1481
- [96] Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T (2003) Stromal cell-derived factor 1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107: 1322-1328

- [97] Yang C, Zhang ZH, Li ZJ, Yang RC, Qian GQ, Han ZC (2004) Enhancement of neovascularization with cord blood CD133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost.* 91: 1202–1212
- [98] Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106 (2): 584–592
- [99] Yusuf-Makagiansar H, Makagiansar IT, Hu Y, Siahaan TJ (2001) Synergistic inhibitory activity of α - and β -LFA-1 peptides on LFA-1/ICAM-1 interaction. *Peptides* 22 (12): 1955–1962
- [100] Zhang P, Ozdemir T, Chung CY, Robertson GP, Dong C (2011) Sequential binding of α V β 3 and ICAM-1 determines fibrin-mediated melanoma capture and stable adhesion to CD11b/CD18 on neutrophils. *J Immunol.* 186 (1): 242-254
- [101] Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595–599

7. Dank

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit, die Dissertation in den Forschungslaboren der Klinik III für Innere Medizin der Universitätskliniken des Saarlandes erstellen zu können.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. med. Erik Friedrich für sein Vertrauen bei der Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Unterstützung und für seine Geduld insbesondere bei der Durchführung der Versuche in der Flusskammer.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Katrin Bachelier für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich für ihre ständige Bereitschaft mir mit ihren wegweisenden Ideen und Kommentaren beratend zur Seite zu stehen bedanken.

Ich bedanke mich auch bei den medizinisch- technischen Assistenten Frau Claudia Schormann und Frau Stephanie Bettink für die Einarbeitung in die Methodik und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen im Labor für die Möglichkeit, mit Ihnen im Team zusammenarbeiten zu dürfen.

Abschließend möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie und all meinen weiteren Blutspendern bedanken, deren Ausgiebigkeit die Voraussetzung zu meinen Versuchen geschafft hat.